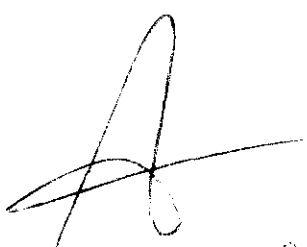
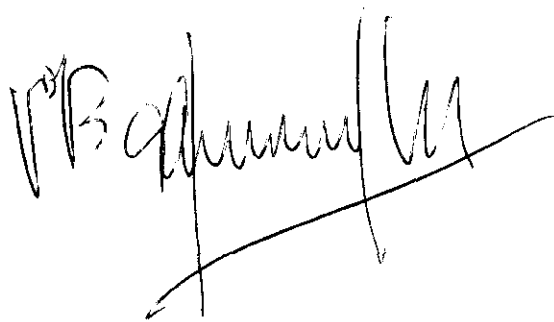


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas



***Terapia inmunosupresora en el modelo de
Nefritis Autoinmune inducida por cloruro de mercurio
en la rata Brown Norway***


Fdo Ana Molina Ocaña


Fdo Francisco Navarro

Tesis para optar al Grado de Doctor
presentada por Ana Molina Ocaña
Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Ramón y Cajal
Diciembre de 1994



HOSPITAL RAMON Y CAJAL
AREA SANITARIA 4
28034 MADRID



FRANCISCO MAMPASO MARTIN-BUTRAGO, Doctor en Medicina, Jefe de la Sección de Inmunopatología del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal y Profesor Titular de la Universidad de Alcalá de Henares de Madrid

CERTIFICA: Que D^a ANA MOLINA OCAÑA, licenciada en CC. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo "Terapia inmunosupresora en el modelo de Nefritis Autoinme inducida por cloruro de mercurio en la rata Brown Norway" y considero que reúne las condiciones necesarias para ser presentada como Tesis Doctoral.

Lo cual firmo en Madrid a 1 de Diciembre de 1994

Fdo. Dr. Francisco Mampaso Martín-Buitrago

A mis padres, *Eufrasio* y *Amalfi*
A *Saturnino*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Francisco Mampaso, Jefe de la Sección de Inmunopatología del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal, por la dirección y supervisión de esta Tesis, y sin cuya ayuda no hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

Agradezco, igualmente, a mis compañeras del Laboratorio de Inmunopatología, Teresa Bricio y Ana Martín, su ayuda desinteresada.

Así mismo, quiero expresar mi gratitud al Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Jefe de la Sección de Inmunología, y al Dr. Vicente Alvarez, Médico Adjunto del Servicio de Nefrología, del Hospital de la Princesa, por su continuo apoyo y asesoramiento científico durante la realización de esta Tesis.

Deseo dar las gracias especialmente a las Técnicas de la Sección de Inmunohistoquímica del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal, Rosa Ocaña, Mela López y Carmen Masa, por su contribución y ayuda técnica.

Agradezco al Dr. Fernando Liaño, Médico Adjunto del Servicio de Nefrología del Hospital Ramón y Cajal, su ayuda que trasciende a la redacción de esta Tesis.

Agradezco, igualmente, al Dr. Vicente Navarro, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica, el haber hecho posible la realización de esta Tesis.

Por último, agradezco al Dr. Agustín G. Zapata, Jefe del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, su tutoría durante mis estudios de doctorado, así como su ponencia y la ayuda facilitada para la presentación de esta Tesis.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la concesión del Proyecto de Investigación del Fondo de Investigación de la Seguridad Social (FISs 92/0420).

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ACF	Adyuvante completo de Freund
AcM	Anticuerpo monoclonal
ADN	Acido desoxirribonucleico
AR	Artritis reumatoide
BN	Ratas de la cepa Brown Norway
BSA*	Albúmina sérica bovina
CD	Grupo de diferenciación
CE	Célula endotelial
Cl ₂ Hg	Cloruro de mercurio
ClNa	Cloruro sódico
ClNH ₄	Cloruro amónico
ConA	Concanavalina A
CS-1	Segemento conectivo-1 de la fibronectiva fruto del procesamiento alternativo de la molécula
CsA	Ciclosporina A
CTL	Linfocito T citotóxico
DE	Desviación estándar
DMDI	Diabetes mellitus dependiente de insulina
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado de Dubelcco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
EM	Esclerosis múltiple
FAAFA	Fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina
FITC	Fluoresceína
FN	Fibronectina
g	Aceleración de la gravedad: 9,8 m/s ²
GM-CSF	Factor estimulador del crecimiento de granulocitos y macrófagos
GSH	Glutación
H&E	Hematoxilina-Eosina
HBSS	Solución salina de Hanks
HEV	Vénulas de endotelio alto
Hg	Mercurio
Hg ²⁺	Ión divalente de mercurio
Ia	Determinante antigénico del MHC clase II de rata
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IL-1rh	Interleuquina-1 recombinante humana
IL-2R	Receptor de interleuquina-2
LAL	Lisado de <i>Limulus ameбocite</i>

LES	Lupus eritematoso sistémico
LEW	Ratas de la cepa Lewis
LFA-1	Antígeno-1 asociado a la función de linfocitos
M	Molaridad
Mac-1	Molécula de adhesión de macrófagos-1
MadCAM-1	Adresina vascular de la mucosa
MBG	Membrana basal glomerular
MCP-1	Péptido quimiotáctico de monocitos-1
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complejo de histocompatibilidad principal
MIP-1 β	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 β
MTT	Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
OPD	Diclorido de orto-fenildiamina
PAS	Acido periódico de Schiffs
PBS	Tampón fosfato salino
PFC	Célula formadora de placas
PMN	Célula polimorfonuclear
p/p	Peso/peso
r ²	Coefficiente de regresión
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo del "Roswell Park Memorial Institute"
SH	Grupo sulfidrilo
SO ₄ H ₂	Acido sulfúrico
SRBC	Glóbulos rojos de carnero
STF	Suero de ternera fetal
TBS	Tampón tris salino
TH1	Linfocito T cooperador tipo 1
TH2	Linfocito T cooperador tipo 2
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFrh	Factor de necrosis tumoral recombinante humano
TNP	Trinitrofenol
Tris	Tris(hidroximetil)amonioetano
UE	Unidad de endotoxina
UAE	Uveorretinitis autoinmune experimental
v/v	volumen/volumen
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares 1
VLA	Antígeno de activación tardía

* Para la redacción de esta Tesis se ha optado por emplear, en el caso de aquellas abreviaturas que no tuvieran bien establecido su uso en castellano, la correspondiente en inglés, dada su frecuente utilización en el lenguaje científico.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. EL MERCURIO Y LA AUTOINMUNIDAD INDUCIDA POR CLO- RURO DE MERCURIO.	2
1.2. LAS CITOQUINAS EN LA AUTOINMUNIDAD	21
1.2.1. Papel de las citoquinas en la nefritis autoinmune.	28
1.3. LAS MOLECULAS DE ADHESION EN LA AUTOINMUNIDAD.	35
1.3.1. Las moléculas de adhesión y el riñón	46
2. OBJETIVOS.	48
3. MATERIAL Y METODOS	51
3.1. ANIMALES.	52
3.2. ANTICUERPOS	52
3.2.1. Antisueros policlonales	52
3.2.2. Anticuerpos monoclonales	53
3.3. MODELO EXPERIMENTAL	53
3.3.1. Inducción de la enfermedad	53
3.3.2. <i>Tratamientos in vivo</i>	55
3.3.2.1. Con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la integrina $\alpha 4$...	55
3.3.2.1.a. Determinación del tratamiento	56
3.3.2.2. Con anticuerpos policlonales dirigidos contra el factor de ne- crosis tumoral α	56
3.3.2.3. Con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno leucocitario común (CD45)	57
3.3.2.4. Transferencia pasiva de antisuero contra la membrana basal glomerular	57
3.4. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.	58
3.4.1. Orina	58
3.4.2. Suero	58
3.4.3. Sangre completa	59
3.4.4. Leucocitos totales	59

3.4.5. Riñón	60
3.4.5.1. Inclusión del tejido en parafina	60
3.4.5.2. Congelación del tejido	61
3.4.5.3. Obtención y cultivo de glomérulos	61
3.4.6. Preparación de la membrana basal glomerular	62
3.4.7. Sonicación de las muestras de proteínas	63
3.4.8. Liofilizado de las muestras de proteínas	63
3.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.	64
3.5.1. Cuantificación de proteínas	64
3.5.1.1. Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares	64
3.5.1.2. Determinación de la concentración de proteína por el método colorimétrico de Bradford	64
3.5.2. Ensayos inmunoenzimáticos	67
3.5.2.1. Niveles séricos de anticuerpos contra componentes de la membrana basal glomerular	67
3.5.2.2. Niveles séricos de anticuerpos contra el ADN monocatenario	68
3.5.3. Interpretación de los ensayos inmunoenzimáticos	69
3.5.4. Determinación de la concentración de endotoxina bacteriana	69
3.5.5. Cuantificación de la concentración de TNF	71
3.5.6. Análisis de leucocitos de sangre periférica	73
3.5.6.1. Recuento de leucocitos periféricos	73
3.5.6.2. Análisis por citometría de flujo	73
3.5.6.2.a. Marcaje directo	73
3.5.6.2.b. Marcaje indirecto	74
3.6. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO	74
3.6.1. Estudio histológico	74
3.6.1.1. Hematoxilina-Eosina	74
3.6.1.2. Acido periódico de Shiffs (PAS)	75
3.6.2. Estudio inmunohistoquímico	75
3.6.2.1. Inmunofosfatasa indirecta	75
3.6.2.2. Inmunofluorescencia directa	76
3.7. CUANTIFICACION DEL INFILTRADO	77

3.7.1. Infiltrado intersticial y perivascular	77
3.7.2. Infiltrado glomerular	77
3.8. ANALISIS ESTADISTICO	78
 4. RESULTADOS	 79
4.1. CINETICA DE LA ENFERMEDAD	80
4.1.1. Proteinuria	80
4.1.2. Histopatología renal	80
4.1.2.1. Lesión tubular	80
4.1.2.2. Infiltrado celular intersticial	82
4.1.2.3. Infiltrado celular glomerular	83
4.1.2.4. Caracterización del infiltrado celular	84
4.1.2.4.a. Infiltrado intersticial y perivascular	84
4.1.2.4.b. Infiltrado glomerular	85
4.1.2.5. Depósitos glomerulares de inmunoglobulina de rata	86
4.1.3. Niveles séricos de autoanticuerpos	96
4.1.3.1. Anticuerpos contra la membrana basal glomerular	96
4.1.3.2. Anticuerpos contra el ADN monocatenario	96
4.1.4. Estudio de las poblaciones leucocitarias circulantes	100
4.2. TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA LA	
INTEGRINA $\alpha 4$	104
4.2.1. Determinación del tratamiento	104
4.2.2. Efecto de la administración de anticuerpos anti- $\alpha 4$ en ratas	
tratadas con Cl_2Hg	104
4.2.2.1. Sobre la proteinuria	104
4.2.2.2. Sobre el infiltrado celular	105
4.2.2.3. Sobre los depósitos glomerulares de Ig	106
4.2.2.4. Sobre la síntesis de autoanticuerpos	106
4.2.2.4.a. Síntesis de anticuerpos contra la MBG	106
4.2.2.4.b. Síntesis de anticuerpos contra el ADN	107
4.2.2.5. Sobre la población leucocitaria de sangre periférica	108
4.2.3. Resultados de la transferencia pasiva de antisuero contra la	
MBG	109

4.3. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE Acs CONTRA EL TNFα	
A RATAS TRATADAS CON Cl ₂ Hg	119
4.3.1. Sobre la proteinuria	119
4.3.2. Sobre el infiltrado celular	119
4.3.3. Sobre los depósitos glomerulares de Ig	120
4.3.4. Sobre la síntesis de autoanticuerpos	120
4.3.5. Sobre la población leucocitaria de sangre periférica	121
4.4. COMPARACION DE LA CINETICA DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS DE LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO CON EL GRUPO Cl₂Hg	128
4.4.1. Número total de leucocitos	128
4.4.2. Expresión de moléculas Ia	128
4.4.3. Población linfocitaria y subclases	128
4.5. RESULTADO DE LA ADMINISTRACION DE Acs CONTRA EL ANTIGENO LEUCOCITARIO COMUN (CD45)	132
4.6. PRODUCCION DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL	136
5. DISCUSION	140
6. CONCLUSIONES	168
7. BIBLIOGRAFIA	173

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. EL MERCURIO Y LA AUTOINMUNIDAD INDUCIDA POR CLORURO DE MERCURIO

El mercurio (Hg^{2+}) es un metal pesado que, al igual que otros agentes de las mismas características (Mg^{2+} , Cu^{+}), tiene un marcado efecto tóxico. La principal característica de este ión divalente es su capacidad de reaccionar con grupos sulfidrilo (SH), estando orientados la mayoría de los estudios sobre su toxicidad a dicha capacidad de reacción con los grupos tiol de las proteínas de membrana responsables de la modulación de la permeabilidad catiónica [Kone y col, 1990] o a su capacidad para generar radicales libres de oxígeno [Stadtman y Oliver, 1991].

Ya en 1981, Gutknecht demostraría que a pH fisiológico el mercurio forma especies neutras que le hacen altamente permeable a las bicapas lipídicas [Gutknecht, 1981]. Una consecuencia del movimiento del mercurio a través de la membrana, en una de sus formas más frecuentes, cloruro de mercurio (Cl_2Hg), es un intercambio Cl^-/OH^- que podría provocar el colapso de los gradientes iónico y pH a través de las membranas biológicas, pudiendo ser ésta la causa de su toxicidad [KarWski, 1992]. Desde que en 1987 Nemeth y Scarpa evidenciaron la rápida movilización del Ca^{2+} celular consecuencia del efecto de algunos cationes divalentes, se ha dado mucha importancia al efecto del Hg^{2+} sobre la homeostasis del Ca^{2+} , ya que su desregulación se evidencia en un incremento de la concentración intracelular de dicho catión [Smith

y col, 1991]. Los experimentos realizados más concretamente sobre linfocitos esplénicos de rata proporcionan idénticas evidencias [Tan y col., 1993]. A pesar de las investigaciones realizadas hasta la fecha aún queda por dilucidar el/los mecanismo/s preciso/s que hacen del mercurio un potente agente inductor de la activación de células linfoides. A este respecto es destacable que existen algunos experimentos realizados *in vitro* sobre linfocitos humanos que contradicen el claro efecto observado *in vivo*, donde se detecta una inhibición de la proliferación [Shenker y col., 1993] y de la diferenciación de células B [Daum y col., 1993].

En definitiva, la capacidad de reaccionar con grupos tiol y su consecuencia en el transporte del Ca^{2+} y otros cationes al alterar la permeabilidad de las membranas biológicas, hace del Hg^{2+} un importante agente tóxico. Al igual que otros metales pesados, resulta especialmente tóxico para el riñón, siendo por ello frecuentemente empleado para provocar el fallo renal agudo en modelos de experimentación.

En estudios previos sobre la nefropatía inducida por metales pesados, en concreto el Hg, se identificó el túbulo proximal como el principal lugar de lesión renal [Gritzka y Trump, 1968]. Gritzka y Trump realizaron un estudio sobre ratas de la cepa Sprague-Dawley que fueron sometidas al tratamiento con Cl_2Hg . Los efectos que observaron sobre las células del epitelio tubular renal fueron muy tempranos en el tiempo desde el inicio de la administración del mercurio. Estos fueron principalmente, la pérdida de las microvellosidades de la membrana plasmática y la formación de vesículas a las 12 horas de recibir el Hg, así como la disyunción celular. A nivel

nuclear se apreciaba una condensación de la cromatina alrededor de la membrana nuclear y los nucleolos, seguido de la fragmentación de la cromatina. Observaron, por otra parte, importantes cambios en las mitocondrias en las que se apreciaba un considerable aumento de su volumen, consecuencia del aumento del contenido de agua. Aunque Gritzka y Trump no dan explicación a los cambios observados en las células del túbulo proximal renal, Kone y col. [1990] sugieren, tras sus investigaciones sobre túbulo proximal de conejo, que el Hg^{2+} (en concentraciones comúnmente empladas en modelos experimentales) causaba un temprano incremento de la permeabilidad iónica de la membrana, seguida por la inhibición de la ATPasa- Na^+ , K^+ , respuesta que precede a la lesión mitocondrial. Posteriormente, Lund y col. [1993] describirían la formación de H_2O_2 y estrés oxidativo en mitocondrias de riñón de rata, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, todas estas lesiones descritas en el epitelio tubular del riñón eran consecuencia de la acción tóxica directa del Cl_2Hg sobre ellas.

Cuando en 1971 Bariéty y col. describen, en un modelo desarrollado en ratas Wistar, que tras la administración subcutánea de cloruro de mercurio se evidenciaba una glomerulonefritis tipo complejos inmunes, ésta no podía ser explicada por el efecto del mercurio sobre el túbulo [Bariéty y col., 1971]. Aún así, el antígeno responsable no fue identificado. Serían Sapin y col. [1977] quienes, al reproducir el modelo en ratas de la cepa Brown Norway (BN), descubrieran el cloruro de mercurio como agente tóxico capaz de inducir la producción de anticuerpos contra la membrana basal glomerular (MBG). Dichos autoanticuerpos circulantes se fijarían a la pared glomerular (evidenciándose por un patrón primero lineal y posteriormente granular

detectado por inmunofluorescencia) y que podría ser la causa del desarrollo de la proteinuria en las ratas BN. Los mismos autores sugerirían que la demostración de una glomerulonefritis tipo complejos inmunes desarrollada en ratas de la cepa Wistar [Bariéty y col., 1971] bajo las mismas condiciones experimentales, podría revelar la existencia de un control genético en este tipo de respuesta inmune.

Druet y col. [1977] confirmarían esta hipótesis al realizar un estudio más detallado sobre el control genético de dicha enfermedad, demostrando que la única cepa sensible capaz de inducir la producción de anticuerpos contra la MBG sería la BN, obteniendo resultados negativos en las cepas Lewis (LEW), Wistar AG, August y PVG/c. El análisis llevado a cabo entre híbridos de estas cepas resistentes y BN les llevó a determinar que dicha susceptibilidad era dependiente de dos o tres genes, uno de los cuales estaría ligado al complejo de histocompatibilidad principal (MHC) de la rata. Aunque ya entonces se había demostrado que otras enfermedades autoinmunes experimentales estaban sometidas a control genético, como era el caso de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) [Williams y Moore, 1973] y la glomerulonefritis por complejos inmunes autólogos [Stenglein y col., 1975], era la primera evidencia de la producción de anticuerpos contra la MBG sometido a control genético.

Las investigaciones de Sapin y Druet abrieron una puerta para el estudio de una de las enfermedades autoinmunes hasta entonces poco conocida. Las glomerulonefritis mediadas por anticuerpos dirigidos contra la MBG se ha reproducido

desde muy temprano en modelos experimentales. Sin embargo, estos modelos siempre suponían la inyección de anticuerpos contra la MBG heterólogos o autoanticuerpos [Unanue y Dixon, 1967]. La enfermedad siempre era inducida después de la inmunización con MBG o con la fracción antigénica de ésta [Shibata y col., 1972]. En un principio, el estudio de la glomerulonefritis inducida por la producción espontánea de estos anticuerpos, tanto en humanos [Wilson y Dixon, 1973] como en animales [Banks y Henson, 1972], no llegó a demostrar el origen de los anticuerpos. En 1975, Zimmerman y col., sugirieron algunos agentes tóxicos como los responsables de glomerulonefritis inducida por anticuerpos contra la MBG en el hombre, aunque ya en 1963, Mandema describió que la intoxicación crónica con mercurio era capaz de inducir en el hombre una glomerulonefritis del tipo complejos inmunes [Mandema y col., 1963]. Por último, serían Sapin y col. [1977] quienes identificaron el Cl_2Hg como agente causal directo de la aparición de autoanticuerpos en la circulación.

Las investigaciones posteriores se centraron en gran medida en el estudio de los mecanismos determinantes de la producción de anticuerpos contra la MBG. La cinética de fijación en la pared glomerular de estos autoanticuerpos fue estudiada inicialmente por Sapin y col. [1977] detectándola, por inmunofluorescencia, dos semanas después del inicio del tratamiento con Cl_2Hg . Hinglais corroboraría que el día 12-13, desde la primera inyección de mercurio, el depósito de IgG de rata sería máximo, detectándose ya a día 8-9 con un patrón todavía débil. Los depósitos aún existían dos meses después [Hinglais y col., 1979]. El estudio de células mononucleares infiltrantes demostró la aparición de monocitos en la luz capilar glomerular y en el

intersticio, coincidiendo temporalmente con la detección inicial de depósitos glomerulares. Además, se identificó un acúmulo de células mononucleares infiltrando los espacios perivasculares [Weening y col., 1978]. La composición de dicho infiltrado era, en cualquier caso, células T y monocitos [Aten y col., 1988a]. A nivel glomerular se han publicado, sin embargo, algunas diferencias al respecto. Mientras que Hinglais demuestra un infiltrado significativo de monocitos a partir del 8º día de enfermedad [Hinglais y col., 1979], Aten sostiene que dicho acúmulo de monocitos se produciría desde el día 4 de enfermedad para ser sustituidos el día 13 por células CD8⁺ [Aten y col., 1988a].

Como ya se ha comentado anteriormente, el carácter genético de la enfermedad y, consecuentemente, la existencia de cepas de ratas resistentes al tratamiento con Cl₂Hg proporcionaría una vía de estudio sobre los posibles mecanismos inductores de la producción de autoanticuerpos en las cepas sensibles. A este respecto, un estudio realizado con la cepa resistente LEW [Sapin y col., 1980] evidenció que la misma enfermedad desarrollada en la cepa BN era reproducible al transferir a ratas de la cepa LEW, previamente irradiadas, células inmunocompetentes procedentes de híbridos F1(LEW X BN), dándole, así, un importante papel a dichas células en el desarrollo de la enfermedad.

La implicación directa de las células inmunes, así como la detección de anticuerpos antinucleares [Weening y col., 1978] y altos niveles de IgE [Prouvost-Danon y col., 1981] en el suero de ratas BN tratadas con mercurio, arrojaría una

nueva luz sobre esta enfermedad autoinmune. Ya en previas publicaciones se demostró que algunas drogas eran capaces de provocar un síndrome semejante al lupus, el cual está asociado a una hiperreactividad de linfocitos B, hipergammaglobulinemia y la producción de autoanticuerpos [Alarcón-Segovia, 1976]. Además, cada vez existían más evidencias de la interacción directa de algunas drogas con células inmunocompetentes como la principal causa de autoanticuerpos, asociándose con una disminución en las funciones efectora y reguladora de las células T [Bluestein y col., 1979; Kirtland y col., 1980]. Basándose en todo ello, Weening y col. proporcionaron una evidencia más utilizando el modelo de autoinmunidad inducida por Cl_2Hg . Demostraron que los linfocitos T de ratas inyectadas con Cl_2Hg tenían una menor capacidad de reactividad y mostraban una pérdida de la función supresora, siendo, todo ello, consecuencia de la acción directa del Hg sobre la población linfocitaria de los animales [Weening y col., 1981].

Un modelo similar desarrollado en ratones genéticamente susceptibles, también mostró la aparición de anticuerpos anti-nucleares [Hultman y Eneström, 1988]. Los estudios realizados por diferentes grupos sobre este modelo de enfermedad autoinmune demuestran la aparición de múltiples anticuerpos diferentes con distintas especificidades. Así, aunque los autoanticuerpos anti-MBG son los más estudiados debido a su marcado carácter patogénico, también se han descrito anticuerpos contra trinitrofenol (TNP), glóbulos rojos de carnero (SRBC) [Hirsch y col., 1982] y recientemente autoanticuerpos anti-mieloperoxidasa [Esnault y col., 1992], cuya aparición parece asociada al desarrollo de una vasculitis generalizada [Mathieson y

col., 1992].

Puesto que en otros modelos experimentales la aparición de anticuerpos circulantes se determinó que era consecuencia de la activación policlonal de células B [Kobayakawa y col., 1979] (proceso que podría tener una significación patogénica en desórdenes autoinmunes) Hirsch y col. [1982] plantearon la misma hipótesis para el modelo de autoinmunidad inducida por mercurio. Analizando el efecto producido *in vitro* por el Cl_2Hg sobre células de bazo procedentes de ratas BN normales, demostraron la inducción de células formadoras de placa (PFC), así como un incremento en la síntesis de inmunoglobulinas. Sin embargo, esta activación policlonal de células B, puesto que se detectan, además de Acs contra la MBG, Acs contra el ADN, 2,4,6-Trinitrofenil (TNP) y glóbulos rojos de oveja (SRBC), no se producía cuando el experimento se intentaba reproducir en linfocitos B aislados y no en células esplénicas totales, lo que evidenciaba un importante papel inicial probablemente de las células T (aunque no quedaba descartado un papel de los macrófagos) sugiriendo una activación policlonal de células B dependiente de células T.

Un hecho importante en este modelo experimental es la cinética que sigue la producción de anticuerpos. El estudio realizado por Hirsch demostró el aclaramiento espontáneo, tanto de Acs contra TNP como ADN y SRBC [Hirsch y col., 1982]. Del mismo modo quedó demostrado que los niveles de Acs contra la MBG [Bellon y col., 1982] y el incremento de los niveles séricos de IgE [Prouvost-Danon y col., 1981] se encontraban sólo de forma transitoria en la circulación. Todo ello permitió concluir

que el Cl_2Hg producía la activación policlonal de células B y que, posteriormente, aparecían mecanismos supresores que provocaban la resolución espontánea de la enfermedad, idea que ya fue sugerida previamente por Weening y col. [1981]. Datos más concluyentes a este respecto los proporcionaron Bowman y col. [1984]. Estos autores, mediante experimentos de transferencia de células esplénicas de ratas tratadas con mercurio, combinados con experimentos de deplección linfocitaria, demostraron el importante papel de las células CD8^+ , que actuarían en esta enfermedad como células T supresoras, regulando la respuesta de anticuerpos contra la MBG. Simultáneamente, se sugirió que, junto con las células T supresoras, aparecerían factores humorales durante la respuesta autoinmune al Cl_2Hg , contribuyendo a la autorregulación de la síntesis de Acs anti-MBG [Chalopin y Lockwood, 1984]. Dichos factores humorales podrían ser anticuerpos anti-idiotipo, cuya participación en mecanismos autorreguladores ya fue previamente demostrado [Goidl y col., 1979; 1983].

Una vez admitido el papel de las células B en la enfermedad y establecido que los autoanticuerpos que aparecen en la circulación son consecuencia de la activación policlonal de éstas, quedaba por determinar cómo se llegaba a la activación de linfocitos B. Previamente se ha comentado que existían evidencias del efecto directo de ciertas drogas sobre células inmunocompetentes, inhibiendo las células supresoras [Bluestein, 1979; Kirtland y col., 1980] o incluso generando un exceso de células T cooperadoras [Miller y Salem, 1982]. En estudios realizados *in vitro* y transferencia a receptores singénicos [Pelletier y col., 1985] se demostró que las células esplénicas de

ratas BN que recibieron el tratamiento con Cl_2Hg eran capaces de inducir la proliferación a los 6 días del inicio de la enfermedad, lo que sugería que uno de los primeros sucesos en el desencadenamiento de la enfermedad era la modificación de algún tipo de célula inmune que llevaría a la activación de células B. El hecho añadido de que las células B aisladas eran incapaces de desencadenar la enfermedad, vuelve a hacer evidente la participación de otra clase de célula en el desarrollo de la lesión autoinmune. A este respecto, la realización de una serie de experimentos demostraron que células T expuestas a Cl_2Hg , tanto *in vivo* como *in vitro*, eran capaces de inducir la proliferación de células T singénicas normales en presencia de células Ia^+ normales [Pelletier y col., 1986]. Los mismos autores identificaron la subclase de linfocitos capaz de provocar tal proliferación como células W3/25^+ (linfocitos T cooperadores) siendo estas células aisladas mucho más efectivas que los linfocitos T no fraccionados (probablemente por evitar el efecto supresor de las células CD8^+). Por otra parte se demostró el requerimiento de células Ia^+ normales para que ocurriera la proliferación, destacando el hecho de que células Ia^+ modificadas no tenían ningún efecto. De esta forma podría excluirse la posibilidad de que el mercurio pudiera modificar determinantes Ia de la superficie celular, como ocurre con haptenos [Eastman y Lawrence, 1982] o drogas [Gleichmann y col., 1983]. En cualquier caso, uno de los primeros fenómenos que ocurren tras la administración del Cl_2Hg es la interacción de células T-T de una forma dependiente del antígeno Ia. Finalmente, Pelletier y col. [1986] sugirieron que el Cl_2Hg inducía, en definitiva, células T autorreactivas, siendo las responsables de la enfermedad autoinmune. Esta era la primera evidencia de la aparición de células T autorreactivas como un suceso inicial

en el desencadenamiento de la autoinmunidad.

Todos los datos acumulados hasta el momento evidencian que la enfermedad se desarrolla en dos fases claras. Una primera fase, de inducción, en la que se produce la activación de células T autorreactivas [Pelletier y col., 1986] y la producción de autoanticuerpos por parte de células B activadas policlonalmente [Hirsch y col., 1982], y una segunda fase de autorregulación, en la que comienza un aclaramiento de Acs en suero [Prouvost-Danon y col., 1981; Bellon y col., 1982; Hirsch y col., 1982] y la resolución espontánea de los síntomas de la glomerulonefritis como consecuencia de dicho aclaramiento [Hinglais y col., 1979]. El análisis de las poblaciones circulantes de células T en ratas tratadas con mercurio [Bowman y col., 1987] reveló una disminución de células T en sangre durante la primera fase de la enfermedad, descenso que se debía en gran medida a la disminución de células T cooperadoras. Simultáneamente, se producía un aumento recíproco de células B (consecuencia de la activación policlonal de estas células). Es de destacar que los autores detectaron una disminución del número de células T citotóxicas/supresoras durante la fase de inducción de la enfermedad, aumentando considerablemente su número durante la fase de autorregulación, lo que coincidía con una disminución en los niveles séricos de Acs. El porqué se produce una disminución en la población de células T cooperadoras podría ser explicado por la masiva infiltración que se produce en el intersticio renal, ya que el 70% al 80% de dichas células eran de fenotipo CD4 [Aten y col., 1988a]. Esta teoría vendría apoyada por similares observaciones en otras respuestas autoinmunes, como es el caso de la EAE [Hauser y col., 1984] en la cual la

disminución de células T cooperadoras coincide con el influjo de éstas en el sistema nervioso central. Sin embargo, estudios realizados en órganos linfoides periféricos sí revelaron una marcada proliferación de linfocitos, tanto T como B [Aten y col., 1988a]. El análisis por citometría de flujo del bazo evidenciaba un temprano aumento (el día 4 de enfermedad) de células CD4⁺, así como un incremento de células portadoras del antígeno MHC clase II el día 8 y 13 que Aten y col. consideran causada por la proliferación de células B. Además de la linfoproliferación B se observaba también un incremento absoluto de la población T, tanto de fenotipo CD4 como CD8, en órganos linfoides periféricos. Pelletier y col. obtendrían similares resultados al realizar un estudio sobre células de órganos linfoides periféricos de ratas BN tratadas. Demostraron una proliferación T y B, aunque sin observar un aumento significativo de células CD8⁺ [Pelletier y col., 1988a]. Puesto que ya fue previamente sugerido que poblaciones T autorreactivas dirigidas contra el antígeno MHC clase II pueden causar la activación policlonal de células B, tanto *in vitro* [Finnegan y col., 1984; Saito y Rajewsky, 1985] como *in vivo* [Saito y Rajewsky, 1985], y que en el modelo de Cl₂Hg se produce una interacción T-T dependiente del MHC clase II [Pelletier y col., 1986]. Aten sugirió un papel para las células T autorreactivas anti-MHC clase II en dicho modelo, proponiendo que el aumento en el número de células CD4⁺ observado en el bazo fuera una evidencia de la aparición de dichas células.

Se consiguieron más evidencias sobre la aparición y participación de células T autorreactivas en esta enfermedad autoinmune a través de la técnica de análisis de dilución límite (LDA) con cuyos resultados se demostró que había una alta

frecuencia de células T autorreactivas que proliferarían en presencia de linfocitos T procedentes de ratas inyectadas con Cl_2Hg , y que existían ya el día 4 de enfermedad, así como de células T cooperadoras anti-Ia propio, capaces de reconocer tanto células B normales como linfocitos B procedentes del día 6 de ratas tratadas [Rossert y col., 1988]. Por último, se demostró mediante transferencia de linfocitos T, y particularmente T cooperadores, que dichas células eran capaces de reproducir la enfermedad autoinmune en los animales receptores [Pelletier y col., 1988b].

El papel que jugaban las células CD8 en este modelo era sin embargo más controvertido. En los mismos experimentos de transferencia de células realizados por Pelletier se pudo comprobar cómo la deplección de células CD8^+ , previa a la transferencia de linfocitos CD4 expuestos al Hg, aumentaba considerablemente la autoinmunidad en los receptores. El hecho de que linfocitos T expuestos a Cl_2Hg indujeran la *proliferación de T citotóxicos/supresores en receptores normales* y que ésta no se produjera en ratas inyectadas con Cl_2Hg parecía demostrar que el mercurio era capaz de afectar cualitativamente a la población celular CD8, como ya fue previamente sugerido [Weening y col., 1981], de forma que la autoinmunidad podría ser debida a la ocurrencia de ambos sucesos: por un lado, la aparición de células T autorreactivas, y por otro, el defecto en la función T supresora [Pelletier y col., 1988b]. Posteriormente, durante el estudio de la fase de autorregulación, en la que se demuestra el aumento del número de células CD8^+ [Bowman y col., 1987], así como que dichas células, cuando proceden de la fase reguladora, tienen un efecto protector sobre la fase de inducción de la enfermedad [Bowman y col., 1984], hizo pensar en un

importante papel de los linfocitos T supresores en su resolución. El tratamiento con Cl_2Hg a ratas de la cepa LEW, en las que el Hg no es capaz de inducir la enfermedad autoinmune [Druet y col., 1977], provoca, sin embargo la aparición de células CD8^+ responsables de un defecto en la función de células T [Pelletier y col., 1988b]. Aún así, existen datos contradictorios al respecto puesto que la deplección de células CD8 en ratas tratadas con Cl_2Hg no era capaz de afectar el desarrollo de la enfermedad, ni siquiera la fase reguladora [Pelletier y col., 1990]. Del mismo modo, la deplección de células T citotóxicas/supresoras en ratas de la cepa LEW inyectadas con Hg, no provocaba el desarrollo de la enfermedad. El hecho de que el tratamiento con Acs anti-CD8 no afectara a la fase de inducción podría sugerir que tales células T, aunque numéricamente normales, serían funcionalmente defectuosas [Pelletier y col., 1988b; Pelleteir y col., 1990]. Los mismos resultados observados durante la fase reguladora, y contrastando con los anteriores experimentos [Bowman y col., 1984; Rossert y col., 1988], evidenciaban que las células T supresoras podrían no estar implicadas en el proceso de autorregulación de la enfermedad, aunque no puede descartarse la posibilidad de que se trate de uno de los numerosos factores implicados.

Un hecho importante, en el estudio realizado por Pelletier, es la aparición de células T anti-Clase II propio cuando las ratas BN normales eran tratadas con Acs anti-CD8 [Pelletier y col., 1990]. Según el autor dichas células, que podrían tratarse de células T autorreactivas, estarían presentes en situaciones normales y constituirían un grupo de células que escaparon de la deplección tímica, encontrándose bajo el control de las células T supresoras [Deusch y col., 1986; Romain y col., 1984; Sano y

col., 1987]. Hasta el momento son muchas las evidencias de un papel de las células CD8 durante la fase de inducción. Pelletier, demostró en ratas BN normales, que los linfocitos CD8⁺ estarían controlando las células T anti-MHC propio. Considerando, además, las múltiples evidencias de una implicación de los CD8⁺ durante la fase de inducción, parecía obvio pensar que los linfocitos T supresores sufrirían realmente un defecto funcional causado por el Hg, lo que impediría el control de las células T autorreactivas y, por tanto, el desarrollo de la enfermedad autoinmune, aunque, como se ha comentado anteriormente, este no sería el único factor desencadenante.

En un reciente estudio realizado por Dubey y col. [1991] en el que analizaron la expresión de moléculas MHC clase II en células B de bazo y ganglio de ratas BN tratadas con Cl₂Hg, encontraron que uno de los sucesos más tempranos acaecidos en dichos animales era el aumento de la expresión de moléculas Ia en linfocitos B el día 3 de la enfermedad, precediendo en cualquier caso a la hipergammaglobulinemia desarrollada en los animales. Idéntico estudio realizado sobre ratas de la cepa LEW mostró que se producía igualmente dicho aumento, pero era regulado a muy corto plazo, volviendo a sus niveles normales. La búsqueda de los factores que determinan la susceptibilidad de ratas BN y no LEW llevaron a Kosuda y col. [1991] a investigar las distintas subclases de células T en esta cepa. Basándose en estudios previos que achacan importantes propiedades inmunorreguladoras a la subclase de células T RT6⁺ en algunos modelos autoinmunes, y siendo su falta o presencia lo que en algunos casos determine la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad [Greiner y col., 1986; Angelillo y col., 1988], Kosuda plantearía la misma hipótesis para estudiar el modelo

col., 1987]. Hasta el momento son muchas las evidencias de un papel de las células CD8 durante la fase de inducción. Pelletier, demostró en ratas BN normales, que los linfocitos CD8⁺ estarían controlando las células T anti-MHC propio. Considerando, además, las múltiples evidencias de una implicación de los CD8⁺ durante la fase de inducción, parecía obvio pensar que los linfocitos T supresores sufrirían realmente un defecto funcional causado por el Hg, lo que impediría el control de las células T autorreactivas y, por tanto, el desarrollo de la enfermedad autoinmune, aunque, como se ha comentado anteriormente, este no sería el único factor desencadenante.

En un reciente estudio realizado por Dubey y col. [1991] en el que analizaron la expresión de moléculas MHC clase II en células B de bazo y ganglio de ratas BN tratadas con Cl₂Hg, encontraron que uno de los sucesos más tempranos acaecidos en dichos animales era el aumento de la expresión de moléculas Ia en linfocitos B el día 3 de la enfermedad, precediendo en cualquier caso a la hipergammaglobulinemia desarrollada en los animales. Idéntico estudio realizado sobre ratas de la cepa LEW mostró que se producía igualmente dicho aumento, pero era regulado a muy corto plazo, volviendo a sus niveles normales. La búsqueda de los factores que determinan la susceptibilidad de ratas BN y no LEW llevaron a Kosuda y col. [1991] a investigar las distintas subclases de células T en esta cepa. Basándose en previos estudios que achacan importantes propiedades inmunorreguladoras a la subclase de células T RT6⁺ en algunos modelos autoinmunes, y siendo su falta o presencia lo que en algunos casos determine la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad [Greiner y col., 1986; Angelillo y col., 1988], Kosuda plantearía la misma hipótesis para estudiar el modelo

de autoinmunidad inducida por Hg, encontrando una importante reducción en el número de células RT6⁺, estando inversamente correlacionado con el desarrollo de la enfermedad. Así, estos autores sugirieron que la auto-tolerancia podría estar basada en un balance entre células reguladoras y efectoras, pudiendo ser alterado dicho equilibrio por numerosos factores (en nuestro caso un agente químico) en animales genéticamente predispuestos.

Hasta el momento todas las investigaciones encaminadas a discernir el factor de susceptibilidad al cloruro de mercurio ha conducido a múltiples conclusiones muchas veces confusas, siendo hoy en día un motivo aún de estudio. Las investigaciones de Mosmann y Coffman [1989] y Janeway y col. [1988] permitieron describir en ratón dos subgrupos funcionalmente diferentes entre linfocitos T cooperadores totalmente diferenciados, y que posteriormente fueron descritos en rata [McKnight y col., 1991]. Se trataba de dos subgrupos celulares con un patrón de secreción de citoquinas distinto. Un subgrupo, denominado TH1, produciría IL-2, IFN-gamma y linfoxina. Otro subgrupo, TH2, sintetizaría IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Ambos grupos estarían reciprocamente regulados. Este descubrimiento abrió una nueva vía para encaminar los estudios, puesto que uno de los puntos más importantes en este modelo de autoinmunidad parece ser el papel que las células T CD4⁺ tiene en el desarrollo de la enfermedad. La aparición de altos niveles séricos de IgE e IgG en las ratas tratadas con Cl₂Hg [Pelleteir y col., 1988a; Prouvost-Danon y col., 1981], al igual que ocurre en ratones y conejos [Hultman y Eneström, 1988; Mirtcheva y col., 1989] parecía indicar que la IL-4 podría ser un importante mediador en la activación de

células B dependiente de linfocitos T [Goldman y col., 1991]. La implicación de dicha citoquina estaba, además, apoyada por los experimentos realizados por Ochel y col., [1991] quienes al tratar a ratones inyectados con Cl_2Hg con un AcM dirigido contra IL-4 observaron una total reducción de los niveles de IgE e IgG1 en los animales. Del mismo modo, la IL-4 podría estar implicada en el aumento de la expresión de moléculas MHC clase II [McCabe y Lawrence, 1990]. Curiosamente estos animales mostraban una mejora en la producción *in vitro* de IL-2 [Baran y col., 1988]. Inicialmente estos datos sugerían que las células TH2, que secretan IL-4, eran las responsables de la estimulación de células B, y esta hiperactividad de las células TH2 estaría asociada con la disminución de la actividad TH1 [Goldman y col., 1991]. Se proponía, así, un balance TH1/TH2 que determinaría, en definitiva, el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

La uveorretinitis autoinmune experimental (UAE) es una enfermedad que puede inducirse en ratas LEW, así como en ratas F1 (LEW x BN), por la inyección del antígeno retinal soluble (Ag-S). La UAE está mediada por células TH1 [Caspi y col., 1986; Higuchi y col., 1991]. Sin embargo, ratas F1 (LEW x BN) tratadas con Cl_2Hg estaban protegidas contra la UAE [Saoudi y col., 1993a]. Si tenemos en cuenta las investigaciones previas realizadas sobre el modelo de mercurio, en el que células TH2 parecen tener un importante papel en la inducción de la enfermedad [Goldman y col., 1991], el efecto observado después del tratamiento con Cl_2Hg podría explicarse por el efecto negativo que las linfoquinas producidas por células TH2 (IL-4 y/o IL-10) ejercerían sobre las células TH1, evitando así el desarrollo de la uveoretinitis. Estos

datos corroborarían la idea inicial de Goldman y col. [1991] y posteriormente propuesta también por Saoudi y col. [1993b] de la importancia de un balance TH1/TH2 en el desarrollo de la autoinmunidad.

Los estudios realizados por Dubey y col. [1993] en los que trata ratas BN inyectadas con Cl₂Hg con un AcM dirigido contra el receptor de IL-2 (anti-IL-2R), corroboró que el subgrupo de células TH1 tenía un importante papel en la enfermedad, pero durante la fase de regulación, aportando así evidencias sobre la resolución espontánea de los síntomas de la enfermedad, que hasta el momento se basaban en datos contradictorios entre los distintos autores sobre el posible papel de las células T supresoras [Bowman y col., 1984] o la participación de anticuerpos anti-idiotipo [Chalopin y Lockwood, 1984; Guéry y col., 1990]. El tratamiento de las ratas enfermas con Acs anti-IL-2R no modificaba la fase de inducción, pero sin embargo sí era capaz de retardar, en parte, la fase reguladora a nivel de producción de IgE y proteinuria, no viéndose afectados otros parámetros. De nuevo se sugerían otros mecanismos reguladores en juego.

Un hecho demostrado en las ratas BN normales era su incapacidad para responder a la concanavalina A (ConA). Estas ratas mostraban, además, una deficiencia en la respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL). Ambos sucesos parecían tener una relación directa con la linfoquina IL-2, puesto que la adición de IL-2 era capaz de restablecer la función de los CTL [Castedo y col., 1994]. Se postulaba, por tanto, que las ratas BN normales, deficientes a la hora de inducir células TH1, después

del tratamiento con Cl_2Hg sufrirían una considerable mejora de las funciones TH1, hecho que se evidenciaba a través de la producción de IL-2.

Hasta la fecha, por tanto, se apoya la idea de un papel inductor de la enfermedad por parte de las células TH2, y un efecto protector ejercido por parte de las células TH1, si bien se considera que para la resolución de la enfermedad deben actuar factores aún desconocidos, sin descartar un papel de las células T citotóxicas, cuya respuesta es restablecida por efecto de la IL-2 producida por las células TH1 [Castedo y col., 1994].

En los últimos años comienza a adquirir una especial importancia el papel de las citoquinas en la autoinmunidad inducida por Cl_2Hg . La demostración de la dependencia de células TH2 durante la fase de inducción y de células TH1 y T citotóxicas durante la de regulación, evidencian la importancia de las citoquinas, ya que es el patrón de secreción de éstas las que determinan, en definitiva la diferencia entre ambos subtipos de linfocitos T CD4^+ .

Por ello merece una especial consideración el papel que tienen las citoquinas en las enfermedades autoinmunes en general, y en el modelo de mercurio en particular.

1.2. LAS CITOQUINAS EN LA AUTOINMUNIDAD

La patogénesis de las enfermedades autoinmunes implica numerosos estadios (iniciación, perpetuación, daño tisular) cada uno de los cuales involucra diferentes interacciones celulares y moleculares. Aunque la respuesta inmune es responsable de la iniciación de enfermedades autoinmunes, los efectores del proceso incluyen muchos miembros de las citoquinas. Estos polipéptidos inducen una amplia variedad de sucesos inflamatorios que contribuyen a la destrucción y remodelación tisular en varias enfermedades autoinmunes [Schattner, 1994]. Actualmente se conocen al menos 60 citoquinas diferentes que se han agrupado en distintas familias (Tabla 1.1). Las interleuquinas y los factores estimulantes de colonias son generalmente inmunomoduladores y factores reguladores del crecimiento de células hematopoyéticas. Funcionalmente, los interferones son agentes anti-virales e inmunomoduladores y las quimoquinas son factores quimiotácticos y reguladores del crecimiento. Los factores de crecimiento controlan las funciones del tejido conectivo, y la familia de factores de necrosis tumoral son inmunomoduladores y reguladores del crecimiento.

Son varias las formas en las que las citoquinas podrían jugar un papel en el proceso de las enfermedades autoinmunes. Citoquinas como IL-1, TNF e IL-6, pueden ser responsables de diversos procesos inflamatorios, asociados frecuentemente con enfermedades autoinmunes. Por otra parte, citoquinas quimiotácticas (como la IL-8), o citoquinas que actúan directamente sobre el sistema inmune (IL-2, IL-4, IL-6 e interferones) pueden afectar al proceso inmune y jugar un importante papel en la

inducción de la autoinmunidad [Cavallo, y col., 1994].

Tabla 1.1. Familias de citoquinas y ejemplos de sus miembros.

Familia	Miembro
Interleuquinas	IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15
Factores Estimulantes de Colonias	G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO
Interferones	IFN- α , IFN- β , IFN-gamma
Quimoquinas	GRO- α , GRO- β , GRO-gamma, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES
Factores de Crecimiento	TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 1.2, TGF- β 3, TGF- β 5, GF, HB-EGF, TGF- α , FGFácido, FGFbásico, β ECGF, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB
Factores de necrosis tumoral	TNF- α , TNF- β (LT)

Gran número de estudios han demostrado la presencia de algunas citoquinas en varias condiciones autoinmunes, siendo la más estudiada la artritis reumatoide (AR), donde se ha detectado IL-6, GM-CSF, IFN-gamma y TNF α [Buchan y col., 1988a; Buchan y col., 1988b]. En la esclerosis múltiple (EM), el fluido cerebroespinal de los pacientes contenía niveles detectables de varias citoquinas, en particular TNF α y β [Selmaj y col., 1991; Sharief y Hentges, 1991]. En el caso de la enfermedad

autoinmune del tiroides se ha detectado IL-1, IL-6 y TNF α [Zheng y col., 1991; Zheng y col., 1992].

La actividad de las citoquinas, bajo condiciones fisiológicas, se ejerce predominantemente sobre las células en un ambiente local, antes que sistémico [Rose, 1989]. Muchas de las actividades de las linfoquinas pueden causar cambios profundos que conducen a la autoinmunidad. Algunos de los síntomas clínicos de enfermedades autoinmunes son atribuibles, además, al efecto de linfoquinas. Por ejemplo, muchas de las alteraciones inmunológicas en el lupus eritematoso sistémico (LES), tales como la activación de células T y B o linfopenia, han sido ligados al efecto de interferones [Schattner, 1988]. Igualmente, muchas de las manifestaciones de la AR pueden ser debidas a la producción local de linfoquinas, especialmente IL-1 y TNF [Lipsky y col., 1989].

La evidencia que tenemos con respecto al papel que las citoquinas juegan en el proceso de enfermedades autoinmunes nos las ha proporcionado el desarrollo de modelos experimentales en animales, bien por inducción en animales normales o bien por el desarrollo espontáneo en algunas cepas de ratas o ratones. Las observaciones en enfermedades autoinmunes en modelos animales son el resultado bien de la manipulación de la enfermedad, inyectando linfoquinas o bloqueando su efecto, o bien del estudio *in vitro* de las células y tejidos de estos modelos para determinar la producción de linfoquinas. De esta forma se demostró que ratones propensos al lupus mostraban un aumento de la síntesis de TNF e IFN-gamma, y las células B

evidenciaban un sorprendente incremento en la producción de autoanticuerpos en respuesta al tratamiento *in vitro* con IFN-gamma o IL-4 [Klinman, 1990]. Además, coincidiendo con el inicio de la enfermedad, se ve aumentada la producción de IFN-gamma en células de ganglios, y puede observarse una expresión de moléculas MHC clase I y II en riñones nefríticos, siendo un suceso secundario a la producción de IFN-gamma [Manolios y col., 1989; Halloran y col., 1988]. La implicación del IFN se evidenció claramente cuando tras la inyección de IFN- α o -gamma (o inductores de IFN) a ratones propensos al lupus se aceleraba considerablemente la enfermedad. Cuando se inyectaba a ratones normales, éstos desarrollaban una tiroiditis o una nefritis tipo complejos inmunes [Schattner, 1988].

Un hecho común en muchos de los modelos de autoinmunidad es la desregulación de la expresión de antígenos MHC implicada en la patogénesis de la enfermedad autoinmune. Avalado por múltiples estudios *in vitro*, puede hipotizarse que algunas citoquinas, especialmente el IFN-gamma [Virelizier y col., 1984; Todd y col., 1985; Wright y col., 1986], juegan un importante papel en la inducción y expresión de moléculas MHC, (efecto potenciado por el TNF α [Weetman y col., 1985]). Estas citoquinas podrían intervenir de esta forma en la presentación antigénica y, por consiguiente, en la producción de autoanticuerpos, lo que les daría un papel en la iniciación de la autoinmunidad. Algunos factores estimulantes de células B, tales como IL-4 e IL-6, podrían desencadenar la proliferación de células B y su diferenciación en células plasmáticas secretoras de autoanticuerpos [Rose, 1989].

Tanto el TNF como la IL-1 β son linfoquinas cuya expresión se ve aumentada en múltiples enfermedades autoinmunes, especialmente en enfermedades renales [Brennan y col., 1989]. Al igual que ocurría con el IFN-gamma, su administración *in vivo* a bajas dosis acelera el desarrollo de la enfermedad, aunque dosis altas resultaban, sin embargo, beneficiosas [Jacob y McDevitt, 1988]. Tales observaciones podrían indicar que el papel de las citoquinas *in vivo* es esencialmente local. Por ejemplo, inyecciones de TNF o IL-1 mejoraban la diabetes en varios modelos animales [Jacob y col., 1990], mientras que estas citoquinas tenían un importante efecto deletéreo local en el páncreas [Held y col., 1990]. El hecho de que algunos órganos, blanco de enfermedades autoinmunes, producen linfoquinas de forma local con efecto perjudicial sobre ellos, viene avalado por recientes experimentos en los que el tratamiento con AcMs dirigidos contra dichas linfoquinas, o la inyección de sus antagonistas, consigue bloquear el curso de la enfermedad [Dinarello, 1991; Kuruvilla y col., 1991]. Así, el tratamiento con anticuerpos anti-TNF consigue prevenir la transferencia de la EAE por células T encefalitogénicas [Ruddle y col., 1990] y previene las lesiones de la vasculitis pulmonar en ratones MRL/lpr [Deguchi y Kishimoto, 1991], entre otras. Muy recientemente, el tratamiento de pacientes afectados de AR con anticuerpos anti-TNF han dado unos resultados preliminares muy alentadores [Elliott y col., 1993]. Del mismo modo, la administración de anticuerpos anti-IFN-gamma es capaz de suprimir la nefritis en ratones NZB/W [Jacob y col., 1987], y en los ratones NOD/Wehi es capaz de reducir significativamente la diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) y disminuir considerablemente la insulinitis [Campbell y col., 1991].

Hay que destacar que muchas de las citoquinas implicadas en procesos relacionados con enfermedades autoinmunes ejercen su efecto principalmente a nivel local, como ha quedado claramente demostrado por la detección de dichas citoquinas en los tejidos específicos afectados. Del mismo modo, la administración local de tales proteínas es capaz de inducir enfermedades autoinmunes, incluso más eficazmente que la administración sistémica [Pettipher y col., 1986; Stimpson y col., 1988].

Otra de las citoquinas que parece tener un importante papel en el desarrollo de la autoinmunidad, y que ha sido muy bien estudiada, es la interleuquina-2. Su implicación ha sido demostrada en varios modelos diferentes. En estudios preliminares se demostró que, tanto en humanos como en modelos animales de enfermedades autoinmunes, los leucocitos eran incapaces de producir IL-2 *in vitro* en respuesta a estímulos no específicos. Es el caso de la DMDI en humanos y en ratas diabéticas, en los que las células mononucleares de sangre periférica mostraban un descenso considerable de la secreción de IL-2 [Lang y col., 1987]. Sin embargo, Kroemer y Wick [1989] han sugerido que un exceso de IL-2 endógeno puede agravar la autoagresión desencadenada por células autorreactivas y favorecer el desarrollo de las condiciones de autoinmunidad. Por otro lado, en experimentos *in vitro* se ha observado la producción de relativamente grandes cantidades de IL-2 durante estados inmunoinflamatorios. Para explicar estos datos, aparentemente contradictorios, se ha sugerido que las bajas cantidades de IL-2 en sobrenadantes de células mononucleares de sangre periférica procedente de pacientes con enfermedades autoinmunes después de la activación con mitógenos podría ser explicada por un exceso de liberación de

receptor de IL-2 (IL-2R). Dicho receptor podría unirse a la IL-2, e inhibir así su actividad biológica, proporcionando un importante papel en la autoinmunidad al sistema IL-2/IL-2R. Además, apoyando esta hipótesis, se han observado altos niveles de IL-2R en el suero de pacientes con DMDI, AR y LES [Cavallo y col., 1994].

Otro mecanismo que ha sido propuesto para explicar la inducción de respuestas autoinmunes es la producción de citoquinas por células diana del proceso autoinmune. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que la producción de citoquinas puede ser inducida en varios tipos de células no inmunes en respuesta a varios estímulos. Es el caso de las células del tiroides, que son capaces de producir IL-1 e IL-6 bajo diferentes condiciones experimentales [Feldmann y col., 1991]. Los mismos estímulos que desencadenan estos mecanismos, y en especial aquellos mediados por IFN-gamma, son capaces también de inducir antígenos MHC y moléculas de adhesión por las células diana [Campbell y col., 1989], lo cual puede promover la activación de una respuesta autoinmune.

En definitiva, las citoquinas se convierten en importantes mediadores, tanto en el inicio, como en el desarrollo y regulación de numerosas enfermedades autoinmunes. La posibilidad de modular las enfermedades autoinmunes mediante la administración de citoquinas o de sustancias que interfieran con la actividad de éstas, pone de manifiesto nuevamente, su importancia en dichas anomalías, proporcionando a la inmunoterapia con citoquinas o antagonistas de citoquinas, una herramienta esencial en el tratamiento y prevención de la autoinmunidad, o al menos de su patología

asociada.

1.2.1. Papel de las citoquinas en la nefritis autoinmune

Desde el descubrimiento de las citoquinas como un grupo de proteínas implicadas en la práctica totalidad de los sucesos inmunológicos, su estudio en las diversas patologías renales, especialmente en aquellas que, como el caso de las nefritis autoinmunes, tienen un importante componente inmunológico, se han convertido en un punto crucial para el entendimiento de los mecanismos que subyacen en toda enfermedad autoinmune. De esta forma, la administración de citoquinas en modelos de animales en los que se ha desarrollado una nefritis autoinmune nos permitirá estudiar el papel que dichas citoquinas juegan en la enfermedad. Por otra parte, la inyección de antagonistas, o AcMs contra estas mismas citoquinas, nos proporciona un nuevo camino para el tratamiento de estas lesiones, en contraste con aquellas terapias que implican la administración de inmunosupresores.

Una de las citoquinas más estudiada en el contexto renal ha sido el TNF, junto con la IL-1. El propósito de determinar la posible implicación de citoquinas en la patología renal llevaron a numerosos grupos a investigar el efecto que sobre algunas enfermedades renales tenía tanto la administración de las propias citoquinas como sus respectivos AcMs. Entre los modelos de nefritis autoinmune quizás el más estudiado ha sido la nefritis nefrotóxica, desarrollado tanto en ratas como en conejos tras la administración de anticuerpos heterólogos anti-MBG. En este modelo animal se determinó que la administración, tanto de TNF recombinante humano (TNFrh) como

humano (TNF α) como de IL-1 α , era capaz de incrementar la lesión causada por la inyección de anticuerpos anti-MBG, consiguiendo aumentar considerablemente la proteinuria [Tomosugi y col., 1989]. Igualmente, la administración crónica de TNF conseguía aumentar el daño glomerular en un modelo murino de nefritis lúpica [Brennan y col., 1989] y era capaz de causar un daño glomerular, a nivel de las células endoteliales del glomérulo, cuando se administraba a conejos [Bertani y col., 1989]. Corroborando estos resultados, el tratamiento con anticuerpos anti-TNF en este último modelo disminuía la proteinuria y las lesiones histológicas [Hruby y col., 1991]. Del mismo modo, al tratar con anticuerpos anti-TNF α o anti-IL-1 β a ratas a las que previamente se les había inducido una nefritis nefrotóxica, se conseguía la disminución de la proteinuria, así como la reducción del infiltrado glomerular de neutrófilos [Karkar y col., 1992]. Sin embargo, como demostrarían Tomosugi y col. [1989], al no detectar ningún cambio a nivel renal tras la administración a ratas normales de TNF o IL-1, el desarrollo de la enfermedad necesita la participación de otros mediadores.

Tras la demostración de que células no inmunes, como las células mesangiales contráctiles de la rata, eran capaces de producir TNF [Baud y col., 1989] y dada la importancia, previamente demostrada, del papel que dicha citoquina juega en el desarrollo de las lesiones renales, Tipping y col. [1991a] estudiaron la producción local de TNF en el modelo de glomerulonefritis experimental inducido en conejos tras la administración de Acs anti-MBG. La producción de TNF en los glomérulos nefríticos estaba estrechamente asociado a la proteinuria y especialmente al influjo de macrófagos en el glomérulo. El aislamiento de tales células infiltrantes demostró

definitivamente que los macrófagos eran los productores de TNF. El estudio de la producción glomerular de IL-1 rendiría idénticos resultados, siendo los macrófagos que infiltran el glomérulo la fuente de IL-1 [Tipping, y col., 1991b]. Aunque en este modelo las células productoras de TNF fueron identificadas como macrófagos, no puede descartarse que otros tipos de células no inmunes en el riñón sean capaces de sintetizar TNF *de novo* en condiciones patológicas. Tras la demostración de las células mesangiales como productoras de TNF, se identificarían las células epiteliales del túbulo, en casos de rechazo renal, como células capaces de sintetizar esta citoquina [Yard y col., 1992].

Por último, un estudio reciente realizado en el modelo murino de nefritis nefrotóxica evidencia nuevamente la implicación del TNF α en el desarrollo de la enfermedad al conseguir, tras la administración de Acs anti-TNF o del receptor soluble de TNF, una reducción significativa de las manifestaciones de la enfermedad [Mulligan y col., 1993a].

Hay que destacar que si bien todos los datos publicados hasta el momento coinciden en el importante papel ejercido por el TNF en las nefritis autoinmunes, especialmente en el inicio y desarrollo de la enfermedad, no ocurre lo mismo con la posible implicación de la IL-1, ya que existen resultados contradictorios al respecto en este tipo de lesiones. Así, mientras Tomosugi y col. [1989] y Karkar y col. [1992] sostienen una participación de la IL-1 en la autoinmunidad, Mulligan y col. [1993a] obtiene resultados negativos al someter a las ratas con nefritis nefrotóxica al

tratamiento con Acs anti-IL-1 o con antagonistas del receptor de IL-1. Curiosamente, en el modelo de nefritis autoinmune inducida por Cl₂Hg los estudios sobre la implicación de citoquinas se han centrado exclusivamente en la participación de éstas a nivel sistémico, no existiendo hasta el momento estudios sobre el papel, o la producción local, de estas moléculas en el órgano blanco de la lesión.

Después de la descripción de dos subgrupos funcionales de células T cooperadoras (TH1 y TH2) [Mosmann y Coffman, 1989; Janeway y col., 1988], y una vez establecida la importancia del balance entre células TH1/TH2 en la determinación de las enfermedades autoinmunes [Goldman y col., 1991; Saoudi y col., 1993b], las investigaciones se dirigieron al estudio de las citoquinas propias de cada uno de los subtipos de linfocitos cooperadores y su efecto en las distintas manifestaciones de la enfermedad.

Uno de los trabajos más preliminares al respecto se centraba en la producción de IL-2 [Baran y col., 1988]. Los autores observaron que las células esplénicas procedentes de ratas tratadas con Cl₂Hg mostraban una deficiencia en la producción de IL-2 cuando eran estimuladas con mitógenos. Sin embargo, cuando células esplénicas de ratas BN normales eran incubadas *in vitro* con Cl₂Hg respondían al mitógeno secretando cantidades significativamente altas de IL-2. Como se ha comentado anteriormente, estos datos tan paradójicos entre los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* se han repetido en un gran número de enfermedades autoinmunes, tanto en humanos como en modelos experimentales. Ya se han mencionado

previamente algunas de las hipótesis barajadas para dar explicación a tan curioso fenómeno. Sin embargo, hay que tener especial cuidado a la hora de extrapolar las observaciones realizadas *in vitro*. En definitiva, se apoya la idea de una clara implicación de IL-2 en el modelo de Cl₂Hg y se interpreta que el Cl₂Hg induce en la cepa BN sensible la producción de IL-2. Una estimulación adicional *in vitro* con mitógenos no es capaz, sencillamente, de "sacar" más IL-2 a los linfocitos. Corroborando esta hipótesis, se ha demostrado que el aparente defecto de la secreción *in vitro* de células linfoides procedentes de LES es reversible simplemente dejando los linfocitos T en reposo [Rosenberg y col., 1984; Huang y col., 1986].

Por último, experimentos *in vivo* han demostrado que el tratamiento de estas ratas con ciclosporina A (CsA), un agente capaz de suprimir la producción endógena de IL-2, puede prevenir y atenuar el desarrollo de la enfermedad [Baran y col., 1986]. Puesto que en este modelo se produce la activación policlonal de células B dependiente de células T autorreactivas, el aumento de IL-2 *in vivo* como consecuencia directa de las inyecciones de Cl₂Hg podría estar implicado directamente en tal activación, como se ha demostrado que ocurre para células B murinas y humanas [revisado en Jelinek y Lipsky, 1987]. La reciente publicación del tratamiento con Acs contra el receptor de IL-2 a ratas inyectadas con mercurio demostró que dicha terapia conseguía retardar la fase reguladora de la enfermedad sin que se viera afectada la fase de inducción [Dubey y col., 1993]. Estos datos apoyarían la teoría de un papel regulador de las células TH1 en la autoinmunidad inducida por Hg, como ya se ha comentado previamente.

Puesto que la síntesis de IgE se ve drásticamente aumentada en este modelo, así como la de IgG, se pensó especialmente en la posibilidad de una implicación de la citoquina IL-4 [Paul y Ohara, 1987]. Cuando Ochel y col. [1991], al reproducir el modelo de mercurio en ratones BALB/c nu/nu, comprobaron que el tratamiento con Acs anti-IL-4 evitaba completamente la producción de IgE e IgG1, concluyeron que el Cl₂Hg activaría preferentemente células TH2, produciendo éstas a su vez IL-4 capaz de inducir la secreción de autoanticuerpos por células B. Además, experimentos *in vitro* demostraron que el tratamiento con Cl₂Hg a células T murinas normales inducía la producción de IL-4 [Pietsh y col., 1989].

Los estudios más recientes han buscado la implicación del IFN-gamma en esta patología. Los experimentos realizados por van der Meide y col. [1993] demostraron que la administración de Cl₂Hg reducía, en gran medida, la capacidad de las células esplénicas de ratas BN para producir IFN-gamma tras la estimulación con mitógeno, una hora después de la administración de la primera inyección. El efecto se veía potenciado tras la segunda inyección, 48 horas después. Como ya se ha documentado previamente, el Hg, como ión bivalente, tiene una gran afinidad por grupos tiol, siendo capaz de unirse ávidamente al glutatión (GSH), por lo que la administración *in vivo* de Cl₂Hg podría implicar tal unión entre el Hg²⁺ y el GSH, bajando, así, la concentración intracelular de GSH y afectando, por tanto, la producción de IFN-gamma.

En definitiva, las linfoquinas juegan un papel esencial en el desarrollo de las

enfermedades autoinmunes, en especial de la nefritis autoinmune inducida por Cl_2Hg , participando en la fase de inducción de la enfermedad como activadores linfocitarios que promueven y exacerban la respuesta inmune. Contribuyen, así, en las diversas manifestaciones patológicas de la enfermedad, como es el caso del desarrollo de una inflamación en el tejido diana de la autoinmunidad. Es esta una de las funciones de las linfoquinas que no hemos tratado hasta el momento y que merece una especial atención por su implicación en el tráfico leucocitario a lugares de inflamación. Hoy en día resulta ya evidente la interdependencia, así como los efectos solapados, de dos sistemas esenciales tanto en la inflamación como en la inmunidad. Nos estamos refiriendo, además de la red de citoquinas ya comentado, al sistema formado por las moléculas de adhesión, cuya importancia en todo proceso inmune toma cada día más relevancia.

1.3. LAS MOLECULAS DE ADHESION EN LA AUTOINMUNIDAD

La migración leucocitaria es el resultado de la interacción entre receptores de membrana de los leucocitos y de moléculas de adhesión expresadas en células endoteliales, como son la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la E-selectina o la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) [revisado en Yednock y Rosen, 1989]. El aumento de expresión de moléculas de adhesión ha sido identificado en los órganos afectados por la autoinmunidad, y del mismo modo se han identificado algunas citoquinas (especialmente TNF, IL-1 e IFN-gamma) como agentes capaces de inducir la activación de las moléculas de adhesión en las células endoteliales, cuyo aumento en la expresión contribuye a un efectivo reclutamiento de linfocitos en los lugares de la lesión [Pober y Cotran, 1991].

Tabla 1.2. Principales familias de moléculas de adhesión y ejemplos de sus miembros.

Familia		Miembros	Ligando
Selectinas		E-selectina	Tetrasacaridos
		P-selectina	Sialil-
		L-selectina	Fucosilados
Superfamilia de Inmunoglobulinas		ICAM-1	LFA-1, Mac-1
		ICAM-2	LFA-1
		ICAM-3	LFA-1
		VCAM-1	VLA-4
		MadCAM-1	$\beta 7\alpha 4$, L-selectina
		PECAM-1	PECAM-1
Integrinas	Familia $\beta 1$	VLA-4 ($\beta 1\alpha 4$)	VCAM-1, fibronectina
	Familia $\beta 2$	LFA-1 ($\beta 2\alpha L$)	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
		Mac-1 ($\beta 2\alpha M$)	ICAM-1, Fibrinógeno, C3bi
		p150,95 ($\beta 2\alpha X$)	C3bi, fibrinógeno

En este punto adquieren una especial importancia las moléculas de adhesión expresadas tanto en células inmunes, como en endotelio y otros tipos celulares. Sus funciones no se limitarán exclusivamente a la migración de células inmunes, sino que además podrán intervenir en la citotoxicidad y en la presentación antigénica [Springer, 1990].

Las moléculas de adhesión pueden dividirse en varias familias (Tabla 1.2). Las selectinas son lectinas que se unen a tetrasacáridos sialil-fucosilados, como el grupo sialil Lewis X. Su principal función la realizan en fases iniciales de la adhesión celular, "capturando" los leucocitos desde la circulación hacia el endotelio vascular. Esta adhesión es transitoria a menos que se activen vías adicionales de adhesión.

La Superfamilia de las Inmunoglobulinas está formada esencialmente por algunos de los ligandos de las Integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$. La interacción receptor/ligando entre ambas familias de moléculas de adhesión tiene como fin establecer una unión más firme de los leucocitos tras la adhesión inicial mediada por selectinas y contribuye a la migración de los propios leucocitos a los tejidos [Springer, 1994]. Un esquema representativo de la implicación de las diferentes familias de moléculas de adhesión en la extravasación de los leucocitos se ilustra en la Figura 1.1.

La activación y función citolítica de los linfocitos también depende de un eficiente contacto entre el receptor y el ligando, en cuyo caso las integrinas vuelven a jugar un papel preferente. En la mayoría de la vasculatura, a excepción de las

vénulas de endotelio alto (HEV) de los órganos linfoides, no se produce un tráfico constitutivo de leucocitos a los tejidos, aunque a pesar de ello, la interacción entre leucocitos y HEV está también mediada por mecanismos de adhesión regulados por citoquinas como el $\text{TNF}\alpha$, la IL-1, el IFN-gamma o el GM-CSF [Chin y col., 1990]. Esto refleja una falta de expresión (o activación) de las moléculas de adhesión, bien en el endotelio vascular o en los leucocitos. Por tanto, cuando en condiciones patológicas se produce la migración a través de la vasculatura de los leucocitos de la sangre periférica a diferentes tejidos debe ponerse en marcha, en principio, un mecanismo que desencadene la expresión o activación de las moléculas de adhesión. Desde el descubrimiento de las moléculas de adhesión se hizo patente la necesidad de las citoquinas como moléculas inductoras, que constituirían el estímulo inicial para poner en marcha una cascada de sucesos, que culminará con la infiltración de leucocitos en el tejido lesionado (Figura 1.1). El ejemplo más claro nos lo proporcionan las moléculas de adhesión del endotelio vascular. Moléculas como la IL-1, el TNF y la endotoxina son capaces de incrementar la adhesión de leucocitos a través de la biosíntesis y expresión de ICAM-1 [Dustin y Springer, 1988; Pober y col., 1986] y la molécula de adhesión endotelial de los leucocitos (ELAM-1) [Bevilacqua y col., 1987], o E-selectina [Bevilacqua y col., 1991]. Posteriormente se identificaría una nueva molécula de adhesión endotelial capaz de ser regulada por citoquinas [Rice y Bevilacqua, 1989], denominada molécula de adhesión de células endoteliales (VCAM-1).

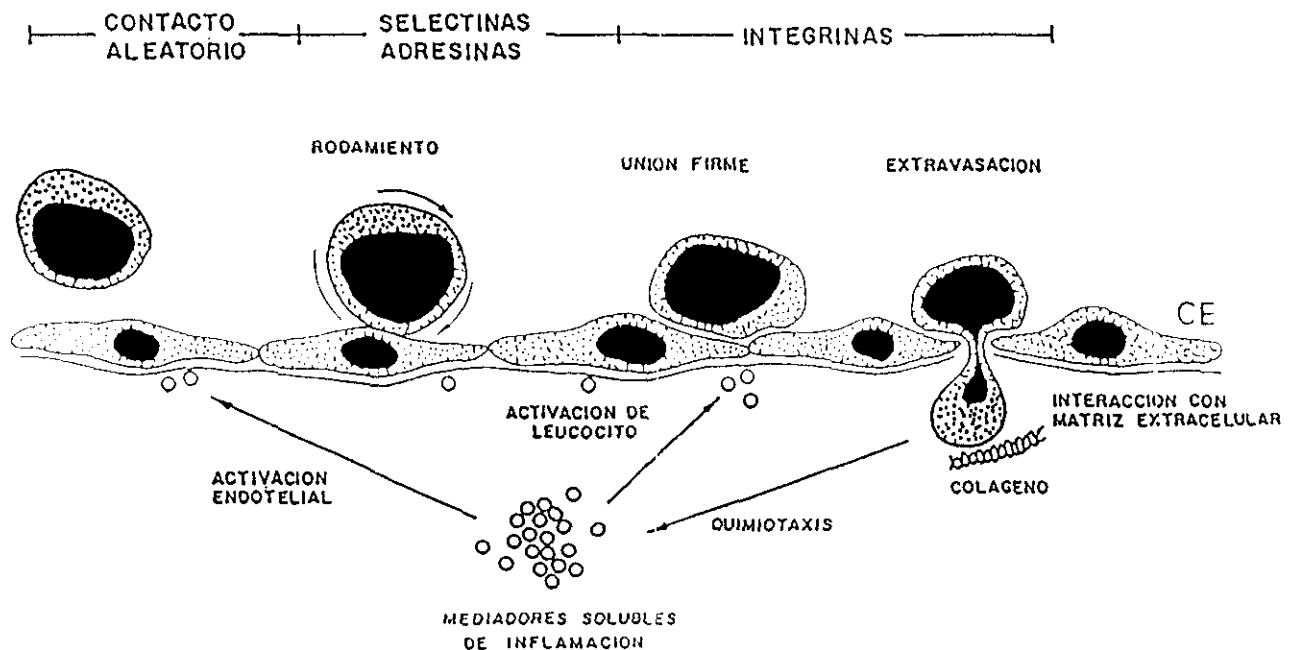


Figura 1.1. Proceso de extravasación leucocitaria a los lugares de inflamación. En este proceso se suceden una serie de etapas en las que irán participando las distintas parejas de receptores de adhesión. Esta "cascada de adhesión" se desarrolla en varios pasos. Tras el contacto aleatorio del leucocito con la célula endotelial (CE), y tras la activación del endotelio por mediadores solubles de la inflamación, se produce el "rodamiento" del leucocito sobre la pared del endotelio, gracias a una sucesión de uniones y desunioniones entre receptores que está mediadas por selectinas y adresinas, cuya cinética de adhesión es muy rápida. En un segundo paso, la acción de agentes quimiotácticos y citoquinas induce la activación de los leucocitos adheridos a la CE. Se activarán moléculas de adhesión como el Mac-1, el LFA-1 o el VLA-4 (pertenecientes a la familia de las integrinas). Estos receptores de membrana permiten una adhesión más estable. Mientras que la activación del Mac-1 promueve la adhesión de células PMN a la CE, en el caso de la extravasación de monocitos y linfocitos, es la integrina VLA-4 (unida a su ligando endotelial VCAM-1) quien juega un papel fundamental. Por último, el leucocito migrará a través del endotelio hasta el tejido inflamado, en cuyo proceso la interacción con la matriz extracelular es esencial, y donde nuevamente intervienen las integrinas [Laffón, 1992].

Un hecho destacable es el carácter selectivo que ha sido demostrado entre las citoquinas para la activación de diferentes rutas de adhesión, pudiendo ser la producción de dichas moléculas la que determine la vía de adhesión que se active en determinadas patologías. Así, se ha demostrado que el VCAM-1 y no el ICAM-1 puede ser inducido en las células endoteliales por la IL-4 y el TNF- α [Thornhill y col., 1991; Galéa y col., 1992], mientras que el IFN-gamma es capaz de inducir el ICAM-1 pero no el VCAM-1 [Wicks y col., 1992]. Además, las citoquinas muestran diferentes resultados en la activación de moléculas de adhesión dependiendo del tipo de vasculatura sobre el que actúan. De esta forma, las mismas citoquinas son capaces de inducir un patrón diferente de moléculas de adhesión cuando actúan sobre la microvasculatura o la macrovasculatura [Gerritsen, y col., 1993].

Las integrinas, que se expresan constitutivamente en los leucocitos en un estado inactivo, son las moléculas de adhesión más versátiles pudiendo ser rápidamente reguladas por las células que las expresan [Springer, 1990; Larson y Springer, 1990]. Los mejores candidatos para la activación de citoquinas en la vasculatura son probablemente los agentes quimiotácticos, como la IL-8, cuyo AcM es capaz de inhibir la migración de neutrófilos a los lugares de inflamación [Sekido y col., 1993]. Otros ejemplos son el MIP-1 β , que aumenta la adhesividad de las células CD8⁺ al VCAM-1 [Tanaka y col., 1993] y la citoquina RANTES, que actúa selectivamente sobre los linfocitos T de memoria [Shall y col., 1990].

Dadas las características de las moléculas de adhesión, son numerosos los

procesos clínicos asociados a dichas moléculas, siendo bastante frecuente la observación de una sobre-expresión de algunos de estos receptores (Tabla 1.3). Así, las alteraciones en el tráfico de linfocitos, estimulado en muchas ocasiones por citoquinas, ocurre en situaciones anómalas del organismo (inflamación). Los linfocitos que se acumulan en tejidos durante las enfermedades autoinmunes son, en su gran mayoría, células de memoria [Mackay, 1992]. El fenotipo de estas células es muy similar al de los linfocitos que circulan durante condiciones basales, lo que sugiere mecanismos moleculares iguales durante la inflamación. Así, en dichas situaciones es posible inhibir significativamente la acumulación de linfocitos con AcMs contra el LFA-1 o el VLA-4 [Scheynius y col., 1993; Chisholm y col., 1993], y casi por completo con una combinación de ambos anticuerpos [Issekutz, 1993].

Desde el conocimiento del importante papel desempeñado por las moléculas de adhesión, especialmente por las parejas receptor/ligando LFA-1/ICAM-1 y VLA-4/VCAM-1, en los mecanismos que subyacen a la infiltración de leucocitos a los lugares de inflamación, se ha buscado incansablemente la relación entre dicha infiltración y un aumento de expresión de tales moléculas. Inicialmente el estudio en la nefritis lúpica murina de la función de las células mesangiales de los glomérulos afectados, evidenció que junto con el incremento de los niveles de algunas citoquinas (IFN-gamma, TNF, IL-1) aparecía un aumento de la expresión del ICAM-1 [Brennan y col., 1990; Wuthrich y col., 1990]. En enfermedades autoinmunes en humanos también ha sido descrito el aumento de expresión o la activación de moléculas de adhesión. Un ejemplo lo proporcionó el estudio por inmunofluorescencia de biopsias

procedentes de una enteropatía autoinmune que reveló la positividad de células LFA-1 e ICAM-1 en la lámina propia [Hill y col., 1992], o en la enfermedad de Graves, donde las células T intratiroidales mostraban un claro aumento de la expresión de moléculas como el LFA-1, el CD2, el VLA-4 y el VLA-5, así como el ICAM-1 en células endoteliales vasculares de capilares y tirocitos [Nagataki y Eguchi, 1992]. En la AR los linfocitos T que infiltran la membrana sinovial muestran un fenotipo activado, manifestado por un aumento de afinidad de los receptores de adhesión por sus ligandos celulares o de la matrix extracelular (MEC) (VCAM-1, ICAM-1) [Postigo y col, 1993a].

Comprobada la clara implicación de las integrinas en el desarrollo de la autoinmunidad parecía obvio que el interferir en la función de estas moléculas de membrana serviría como tratamiento o prevención. En la tabla 1.4 se resume el uso terapéutico de anticuerpos dirigidos contra algunas de las moléculas de adhesión más significativas. Los experimentos desarrollados en múltiples modelos animales de autoinmunidad manifestaron que la administración de anticuerpos dirigidos contra diferentes moléculas de adhesión a los animales afectados podía causar algún efecto sobre la enfermedad. Enfermedades como la EM o tiroiditis autoinmune experimental han dado resultados satisfactorios al ser tratadas con AcMs contra el LFA-1 o el ICAM-1 [Tsukada y col., 1993; Metcalfe y col., 1993]. Del mismo modo, el bloqueo de la ruta VLA-4/VCAM-1 conseguiría idénticos resultados. En la AR Dinther-Janssen y col. [1991] concedían más importancia a la vía VLA-4/VCAM-1 en la mediación de la adhesión de linfocitos al endotelio inflamado que a la ruta LFA-1/ICAM-1 en el

sinovio reumatoide.

Como ya se ha comentado anteriormente, el patrón de citoquinas producido por las células inmunes puede determinar las moléculas de adhesión que serán expresadas o activadas. En las distintas patologías, como ha quedado demostrado por la eficacia o no de diferentes tratamientos, será una u otra vía de adhesión la que adquiera mayor importancia. Es el caso de la AR, donde la interacción de VLA-4 con VCAM-1 es necesaria para que penetren las células T en el tejido [Laffón y col., 1991; Postigo y col., 1992; van Dinther-Janssen y col., 1991], o de la EAE, en cuyo caso ha quedado claramente evidenciada la preferencia, frente a LFA-1/ICAM-1 [Willenborg y col., 1993], de la ruta VLA-4/VCAM-1, demostrándose, además, *in vivo* que el tratamiento con anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 1$ [Yednock y col., 1992] o anti-VCAM-1 [Baron y col., 1993] inhiben la acumulación de leucocitos en el sistema nervioso central. En la alergia también se ha sugerido un papel de VLA-4 al ser suprimida la acumulación de neutrófilos por anticuerpos anti-VLA-4 [Weg y col., 1993].

Tabla 1.3. Procesos clínicos asociados con moléculas de adhesión

INTEGRINAS

LFA-1	<ul style="list-style-type: none"> -Deficiencia genética en LAD. -Expresión aumentada en síndrome de Down. -Requerido por HIV para infectar células T CD4⁺. -Correlación de aumento de expresión y crecimiento de mieloma múltiple. 	<p>Anderson y Springer, 1987 Taylor y col., 1988</p> <p>Pantaleo y col., 1991</p> <p>Ahsman y col., 1991</p>
Mac-1 y pg150	<ul style="list-style-type: none"> -Sobre-expresión en neutrófilos de pacientes con neutropenia inducida por hemodiálisis. 	<p>Alvarez y col., 1991</p>
VLA-1	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de la expresión en células T sinoviales de artropatías crónicas. 	<p>Hemler y col., 1986</p>
VLA-2	<ul style="list-style-type: none"> -Receptor para <i>Echovirus I</i>. -Aumento de la expresión en cáncer de pulmón. 	<p>Bergelson y col., 1992 Chen y col., 1991</p>
VLA-4	<ul style="list-style-type: none"> -Expresión por melanomas metastásicos. -Aumento de la expresión en células T sinoviales de AR. -Sobre-expresión por células infiltrantes en el rechazo de trasplante. 	<p>Rice y Bevilacqua, 1989 Laffón y col., 1991</p> <p>Mampaso y col., 1993</p>
VLA-5	<ul style="list-style-type: none"> -Receptor de proteínas bacterianas implicadas en la penetración celular. 	<p>Nhieu e Isberg, 1991</p>

(continua en la página siguiente)

Tabla 1.3. Procesos clínicos asociados con moléculas de adhesión (cont.)

SUPERFAMILIA DE Ig

ICAM-1	<ul style="list-style-type: none"> -Expresado en placas arteroescleróticas. -Receptor de <i>rhinovirus</i>. -Receptor de <i>Plasmodium falciparum</i>. -Expresión <i>de novo</i> en células tubulares durante el rechazo de trasplante. -Forma soluble en suero en pacientes con metástasis hepática. -Positivo en vasos sanguíneos en inflamaciones cutáneas alérgicas. 	<p>Poston y col., 1992 Greve y col., 1989 Stauton y col., 1989 Brendt y col., 1989 Mampaso y col., 1993</p> <p>Tsujisaki y col., 1991</p> <p>Kyan-Aung y col., 1991</p>
VCAM-1	<ul style="list-style-type: none"> -Lugares de inflamación aguda y crónica. -Expresión <i>de novo</i> en el endotelio en la nefritis tubulointersticial. -Aumento de expresión por células tubulares endoteliales y epiteliales en rechazo de trasplante. -Expresado en placas arteroescleróticas. 	<p>Rice y col., 1991 Mampaso y col., 1992</p> <p>Mampaso y col., 1993</p> <p>Cybulsky y Gimbrone, 1991</p>

SELECTINAS

E-Selectina	<ul style="list-style-type: none"> -Presente en endotelio en lugares de inflamación aguda y crónica. -Media la adhesión de células de carcinoma de colon a endotelio. 	<p>Koch y col., 1991</p> <p>Dejana y col., 1992</p>
L-Selectina	<ul style="list-style-type: none"> -Se ha sugerido un papel en la patogénesis de la encefalomiелitis autoinmune experimental. 	<p>Huang y col., 1991</p>

En modelos animales de glomerulonefritis autoinmunes, aunque no son muchos los trabajos publicados al respecto, Mulligan y col. [1993a] realizaron un amplio estudio de la necesidad de moléculas de adhesión en la nefritis nefrotóxica sometiendo, para ello, a distintos tratamientos con anticuerpos bloqueantes de diferentes moléculas de adhesión a los animales. Sus resultados demuestran que ni el LFA-1 ni la E-selectina tienen implicación en la nefritis nefrotóxica. Sin embargo, tanto el VLA-4 como el ICAM-1 y el Mac-1 intervienen en el desarrollo de la proteinuria de los animales enfermos, como demuestra la reducción que experimentan en la excreción de proteínas las ratas sometidas al tratamiento con los mencionados Acs. En este modelo Mulligan y col. parecen descartar un papel para el LFA-1. Por el contrario, Kawasaki y col. [1993], en un modelo de glomerulonefritis similar, demuestran que repetidas inyecciones de anti-ICAM-1 o de anti-LFA-1 es capaz de inhibir el desarrollo de la proteinuria y el influjo de células de una forma dosis dependiente.

Los datos existentes hasta el momento, como puede apreciarse, son escasos y contradictorios dejando poco claro la posible implicación de las moléculas de adhesión en los modelos de glomerulonefritis autoinmunes, si bien en otros modelos experimentales de autoinmunidad ha quedado claramente evidenciado el importante papel que ejercen determinadas moléculas de adhesión en el desarrollo de las mismas.

1.3.1. Las moléculas de adhesión en el riñón

A nivel renal son muchos los estudios, tanto en animales como en humanos, que han demostrado la implicación de moléculas de adhesión en situaciones fisiológicas y patológicas. En humanos el riñón expresa normalmente una variedad de integrinas $\beta 1$, localizándose preferentemente en glomérulos e intersticio renal [De Strooper y col., 1989]. El VLA-4 puede expresarse de forma focal en el epitelio tubular, así como en los macrófagos tisulares y en las células dendríticas o en la matriz del intersticio renal [Molina y col., 1992]. Moléculas como el ICAM-1 y el ICAM-2 se expresan constitutivamente en el endotelio vascular renal, incluyendo capilares glomerulares e intertubulares [Rothlein y col., 1986]. Sin embargo, el VCAM-1, al ser una molécula inducible, no se expresa en condiciones fisiológicas en el riñón [Elice, y col., 1990].

En enfermedades renales, como algunas glomerulonefritis, puede observarse un ligero aumento del VLA-5 en el mesangio [Kerjaschki y col., 1989], así como una expresión del ICAM-1, que podía llegar al 50% en el caso de infiltrado intersticial, correlacionada con la expresión anómala de antígenos de clase II en el epitelio tubular renal [Muller y col., 1991]. En nefritis tubulointersticiales el 95% y 50% del componente celular intersticial expresan LFA-1 y VLA-4, respectivamente, sin que existan diferencias en la expresión del ICAM-1 en el endotelio vascular con respecto a riñones normales, ni expresión anómala de esta molécula en el epitelio tubular. Sin embargo puede apreciarse una expresión anómala del VCAM-1 en el endotelio vascular y el epitelio tubular [Mampaso y col., 1993].

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La enfermedad inducida en las ratas Brown Norway por la administración de Cl_2Hg constituye un modelo idóneo para el estudio de los mecanismos responsables del desarrollo de enfermedades autoinmunes, al ejercer su efecto sobre algunas subpoblaciones de células circulantes, que serán las inductoras de una activación en cadena de las células periféricas que en último extremo provocarán la activación policlonal de células B y la consiguiente síntesis de autoanticuerpos.

La aparición, entre otros autoanticuerpos, de Acs contra determinantes antigénicos de la membrana basal glomerular, hace de nuevo a este modelo ideal para el estudio de la glomerulonefritis que se desarrolla en estas ratas como consecuencia del depósito de estos Acs en la membrana basal del glomérulo.

El objetivo inicial de esta tesis es abordar estos dos aspectos de la enfermedad inducida por Cl_2Hg . En base a las características de ésta, tanto a nivel de activación de células circulantes y producción de Acs, como a nivel exclusivamente renal, y teniendo en cuenta los estudios previos realizados sobre diferentes enfermedades autoinmunes, así como distintos tipos de nefritis, los objetivos perseguidos fueron los siguientes:

1. Determinar un tratamiento preventivo de la enfermedad utilizando un AcM dirigido contra la integrina $\alpha 4$ con el fin de bloquear tanto su unión a VCAM-1 como a fibronectina, evitando de esta forma el acúmulo de células hematopoyéticas en el

riñón.

2. Teniendo evidencias *in vitro* de la posible existencia de un tercer ligando para $\alpha 4$, cuya unión con su receptor favorece la interacción entre linfocitos, y habiéndose determinado en nuestro modelo la activación de las células B de una forma dependiente de las células T, buscamos evidencias *in vivo* de esta tercera función de $\alpha 4$, así como su posible implicación en la activación celular.

3. Consideramos un nuevo objetivo determinar el papel del $\text{TNF}\alpha$ en esta enfermedad, así como valorar la administración de Acs contra el $\text{TNF}\alpha$ como un posible tratamiento preventivo de la nefritis autoinmune inducida por el Cl_2Hg . La elección de una citoquina se realizó en base a la conocida importancia de estos mediadores solubles en el desarrollo de muchas de las nefritis descritas. Además, se tuvo en cuenta el importante papel del $\text{TNF}\alpha$ como factor quimiotáctico, sin olvidar su capacidad como inductor de moléculas de membrana, como el VCAM-1, conocido ligando en las células endoteliales de la integrina $\alpha 4$.

3. MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. ANIMALES

Se utilizaron para todos los experimentos ratas de la cepa singénica Brown Norway (BN) de 8 a 10 semanas de edad y con un peso aproximado de 170 a 180 gr. Los animales se obtuvieron de IFA-CREDO (París, Francia) y se mantuvieron durante todo el estudio en condiciones estándar con libre acceso a agua y comida.

3.2. ANTICUERPOS

3.2.1. Antisueros policlonales

Los antisueros policlonales contra la IgG de rata, así como contra la Ig total (A, M y G) de rata han sido utilizadas tanto en forma no conjugada, como conjugadas con fluoresceína (FITC) y peroxidasa. El antisuero contra la IgG de rata procede de oveja, al igual que sus formas conjugadas. El policlonal contra la Ig de rata, en todas sus formas, es un antisuero de conejo. Todos ellos han sido adquiridos de Serotec (Oxford, Inglaterra).

El antisuero de conejo contra la citoquina $\text{TNF}\alpha$ de humanos utilizado [Beezhold y col., 1989] reconoce el $\text{TNF}\alpha$ de rata [Chin y col., 1990]. Se trata de un policlonal con carácter neutralizante capaz de bloquear la unión del $\text{TNF}\alpha$ a su receptor celular. Este policlonal ha sido adquirido de Genzyme Co. (Cambridge, MA, USA).

3.2.2. Anticuerpos monoclonales

Todos los anticuerpos monoclonales utilizados se recogen en la tabla 3.1, detallándose en ésta su especificidad. Todos ellos se tratan de monoclonales de inmunoglobulinas de ratón del isotipo IgG1. De los anticuerpos recogidos en la tabla OX6, OX8, OX19, OX33 y W3/25 se han empleado también en su forma conjugada con fluoresceína.

El anticuerpo monoclonal de ratón contra inmunoglobulinas de pollo conjugado con fluoresceína tiene un isotipo IgG1 y ha sido utilizado como control negativo para los ensayos realizados con el citómetro de flujo. Todos los anticuerpos han sido obtenidos de Serotec a excepción del monoclonal HP2/1 que ha sido cedido por el Dr. F. Sánchez-Madrid [Sánchez-Madrid y col., 1986].

3.3. MODELO EXPERIMENTAL

3.3.1. Inducción de la enfermedad

La enfermedad autoinmune se indujo por medio de la administración de mercurio (metal pesado con conocida capacidad nefrotóxica y activador policlonal de células B) según el protocolo descrito por Sapin y col. [1977]. Los animales recibieron el mercurio en forma de una solución de cloruro de mercurio (Cl_2Hg) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI, USA) en agua destilada, repartido en dosis de 1 gr de Cl_2Hg por Kg de peso corporal del animal en inyecciones subcutáneas (s.c.) en la región dorsal superior, administrándose a razón de tres dosis semanales. El número total de éstas no excedió en ningún caso las cinco inyecciones.

Tabla 3.1.- Anticuerpos monoclonales.

AcMs	Isotipo	Especificidad	Referencia
HP2/1	IgG1	CD49d;integrina VLA-4	Sánchez-Madrid y col., 1986 Yednock y col., 1992
OX1	IgG1	Todos los linfocitos	Sunderland, 1979 Barclay, 1981
OX19	IgG1	Linfocitos T	Barclay, 1981 Dallman y col., 1982
OX8	IgG1	CD8;linfocitos T cito- tóxicos y supresores	Barclay, 1981 Brideau y col., 1980 Dallman y col., 1982
W3/25	IgG1	CD4;linfocitos T coope- radores	Williams y col., 1977 Barclay, 1981 Brideau y col., 1980
OX6	IgG1	Antígenos MHC de Clase II(RT1.B)	McMaster y Williams, 1979 Barclay, 1981
OX33	IgG1	Linfocitos B (CD45)	Wollett, 1985
ED1	IgG1	Monocitos y macrófagos	Dijkstra y col., 1985

Tabla 3.1. Características de los anticuerpos monoclonales. En la tabla se recogen, a modo de resumen, algunas de las principales características de los anticuerpos monoclonales utilizados en esta tesis. La fuente de procedencia de éstos se especifica en el texto (apartado 3.2.2).

Un grupo de animales (n=71) no recibió ningún tratamiento adicional, desarrollando libremente la enfermedad. Su seguimiento serviría para determinar los parámetros de la lesión a lo largo del curso de ésta.

El control negativo normal de la enfermedad lo constituiría un grupo de ratas (n=32) a las que se inyectó agua destilada a un pH 3.8 (pH idéntico al que tenía la solución de mercurio utilizada) administrada de la misma forma que el cloruro de mercurio.

3.3.2. Tratamientos *in vivo*

Algunos grupos de animales a los que se les indujo la enfermedad autoinmune con mercurio, recibieron un tratamiento adicional con diferentes AcMs:

3.3.2.1. Con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la integrina $\alpha 4$

Un grupo de animales (n=60) recibió un tratamiento adicional con un AcM dirigido contra la cadena α de la molécula de adhesión VLA-4 de humanos, (clon HP2/1) [Sánchez-Madrid y col., 1986]. Dicho AcM es capaz de bloquear los sitios de unión de VLA-4 con sus dos ligandos conocidos, fibronectina (FN) y VCAM-1 [Pulido y col., 1991b], inhibiendo, por tanto, todas las funciones dependientes de dicha unión. A pesar de tratarse de un anticuerpo dirigido contra humanos, también reacciona con la cadena α del receptor VLA-4 de rata [Yednock y col., 1992].

3.3.2.1.a. Determinación del tratamiento. Con el fin de precisar, tanto la dosis de HP2/1 a inyectar a los animales, como los días en los que éste debía ser administrado, se realizó un estudio previo en el que se valoró el efecto causado sobre la enfermedad utilizando distintas dosis y tiempos a lo largo del curso de ésta. Basándonos en estudios anteriores realizados con este mismo AcM para el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes [Yednock y col., 1992], se determinó un rango a partir del cual realizar un ensayo sobre la dosis a inyectar. Por otra parte, los días se eligieron teniendo en cuenta la cinética que seguía la enfermedad:

- Administración de HP2/1 en una única dosis intraperitoneal (i.p.) de 1,5 mg el día 0 de la enfermedad.
- Administración de HP2/1 en dos dosis i.p. de 0,5 mg cada una los días 0 y 4 de la enfermedad.
- Administración de HP2/1 en tres dosis i.p. de 0,5 mg cada una los días 0, 8 y 13 de la enfermedad.

Para valorar las distintas dosis de HP2/1 se estudió en principio el efecto que éstas podían causar sobre la excreción de proteínas en orina. Por ello se administró el AcM HP2/1 de las distintas formas y cantidades mencionadas arriba, y se recogieron las orinas de 24 horas a distintos días del experimento.

3.3.2.2. Con anticuerpos policlonales dirigidos contra el factor de necrosis tumoral

Del mismo modo que se hizo para el tratamiento adicional con HP2/1, tomamos un grupo de $n=60$ ratas a las que se inyectó las dosis pertinentes de Hg (apartado 3.3.1) para inducir la enfermedad autoinmune. A este grupo de animales se le administró, vía intraperitoneal, el Ac contra la citoquina $\text{TNF}\alpha$, siguiendo idéntico protocolo al utilizado para HP2/1. Esto es, les fue administrado una dosis total de 75.000 unidades neutralizantes de dicho anticuerpo repartido en tres dosis de 25.000 unidades neutralizantes cada una los días 0, 8 y 13 de enfermedad.

Para determinar la dosis administrada nos basamos en la experiencia de nuestro propio laboratorio [Martín y col., 1994], según el efecto producido en la excreción de proteínas en orina.

3.3.2.3. Con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno leucocitario común (CD45).

Un grupo de ratas ($n=32$) recibieron el tratamiento con el AcM dirigido contra el antígeno leucocitario común (CD45), denominado OX1, el cual se utilizó como anticuerpo irrelevante. Este grupo de animales se empleó como control de los restantes tratamientos *in vivo*, por cuyo motivo se administró de la forma convenida para los Ac HP2/1 y anti- $\text{TNF}\alpha$.

3.3.2.4. Transferencia pasiva de antisuero contra la membrana basal glomerular

Un grupo de ratas a las que se indujo la enfermedad autoinmune con mercurio

fueron sangradas por punción de la vena de la cola el día 13. Tras determinar los existencia de altos niveles séricos de anticuerpo contra la MBG en cada uno de los sueros obtenidos (según se explica en el apartado 3.5.2.1), se hizo una mezcla con éstos y se determinó de la misma forma el nivel de anticuerpo contra la MBG.

Una cantidad de 800 μ l/rata de este antisuero (volumen que se determinó en base a su contenido de anticuerpos contra la MBG) fue inoculada el día 8 vía intravenosa (i.v.) a través de la vena de la cola a un grupo de animales (n=6) que además recibieron el tratamiento con HP2/1. Otro grupo de animales (n=4), sin recibir tratamiento previo, también fueron inoculados con el antisuero.

3.4. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

3.4.1. Orina

La recogida de muestras de orina se llevó a cabo en jaulas metabólicas en las que se mantenía a las ratas por un período de 24 horas con libre acceso a agua y comida. La toma de muestras se realizó a intervalos regulares empezando desde el día 0 y hasta el día 23 del experimento. Una vez recogidas las orinas se centrifugaron durante 10 min a 1.000 rpm y se eliminó el precipitado.

3.4.2. Suero

Los animales sometidos a estudio fueron sangrados practicando una punción en la vena de la cola. Las muestras de sangre se tomaron en días alternativos durante

todo el experimento. La sangre se recogió en tubos de vidrio recubiertos de silicona y se procedió a la separación de los sueros [Johnstone y Thorpe, 1987]. Para ello, se dejó que la sangre se coagulara durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez retraído el coágulo se recogió el suero y se centrifugó el coágulo a 2.500 g durante 30 min a 4°C y se recuperó el resto del suero libre de células. Los sueros ya separados se centrifugaron a 1.500 g de 15-20 min a 4°C. Se alicuotaron y congelaron a -20°C hasta su uso.

3.4.3. Sangre completa

Las muestras se recogieron tanto del grupo de animales que desarrollaron la enfermedad (tratado con mercurio únicamente) como de los grupos que recibieron el tratamiento adicional con HP2/1, anti-TNF α y ambos controles. Los días determinados para la obtención de sangre fueron los días 0, 8, 13 y 23, como días críticos de la enfermedad.

Las muestras de sangre se obtuvieron como se explica en el apartado 3.4.2, excepto que la sangre se recogió en tubos de vidrio con heparina sódica para evitar su coagulación.

3.4.4. Leucocitos totales

Cuando fue necesario se procedió a la eliminación de los eritrocitos de las muestras de sangre. Para ello, tras añadir a la muestra una cantidad arbitraria de

solución salina de Hanks (HBSS) (Flow, Irvine, Scotland, UK) se centrifugó durante 10 min a 1.400 rpm y se recuperaron las células sedimentadas que fueron incubadas en una solución Tris- ClNH_4 160 mM (pH 7.5) durante 15 min a temperatura ambiente y en constante agitación. Tras la incubación se realizaron dos lavados de la muestra con HBSS y los leucocitos libres de eritrocitos fueron resuspendidos a la concentración celular pertinente.

3.4.5. Riñón

Después de anestesiarse a los animales con 5 mg/100 gr de peso del animal de pentobarbital sódico, los riñones fueron perfundidos a través de la aorta abdominal con 100 ml de suero salino fisiológico a 37°C [Griffith y col., 1967], realizándose en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar (Gelaire, Flow) cuando el experimento así lo requiera, seccionando además la vena renal izquierda para permitir la libre salida del líquido perfundido. Los riñones extraídos fueron procesados para su estudio histopatológico o para el cultivo de glomérulos.

Las muestras renales se tomaron los días 0, 8, 13 y 23 de la enfermedad, además de los días 4 y 11 para la obtención de glomérulos (apartado 3.4.5.3). Igualmente fueron tomadas muestras de 24, 48 y 72 horas para el estudio del daño tubular renal.

3.4.5.1. Inclusión del tejido en parafina

Una parte de la muestra renal fue procesada para su estudio por microscopía

óptica. El tejido renal se fijó durante 24 horas en formol-salino tamponado al 10%. Después de deshidratar el tejido en baños crecientes de alcohol etílico y por último en xilol, la pieza de tejido se incluyó en parafina líquida y se mantuvo en la estufa a 58-60°C, realizando cada 2 horas un cambio de parafina, hasta un total de tres cambios. Tras moldear el bloque de parafina y enfriarlo, se hicieron los cortes de tejido en un microtomo, a 2-3 μm , manteniendo las preparaciones toda una noche en estufa a 60°C para, posteriormente, desparafinar el tejido en xilol y volver a rehidratar el corte renal desde alcohol etílico absoluto a agua. Una vez procesado el tejido se procedió a su estudio histológico (apartado 3.6.1).

3.4.5.2. Congelación del tejido

El resto de la muestra se procesó para el estudio inmunohistoquímico (apartado 3.6.2), por lo que se congelaron las piezas de tejido en nitrógeno líquido, incluyéndolas, previamente, en OCT (Miles Laboratories, Naperville, Illinois, USA). Las muestras se almacenaron en isopentano (2-metil butano) a -70°C hasta su uso.

3.4.5.3. Obtención y cultivo de glomérulos.

Los riñones procedentes de ratas de todos los grupos a diferentes días a lo largo de la enfermedad fueron descapsulados y eliminada la médula. La corteza renal fue fragmentada y procesada según la técnica descrita por Burlington y Cronquite [1973], procediendo al tamizado selectivo de la corteza renal pasando la muestra por poros decrecientes (250, 150 y 75 μm). Los glomérulos se recogieron del tamiz con

poro más pequeño obteniéndose una suspensión con más de un 95% de glomérulos libres de fragmentos tubulares. Esta suspensión se lavó 2 a 3 veces en HBSS y se resuspendieron en RPMI 1640 (Whittaker, Bioproducts, Walkerville, MD, USA) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (STF) (Flow), 100 mg/ml de Ampicilina, 100 mg/ml de Estreptomicina y 100 mM de glutamina a una concentración final de 5×10^3 glomérulos/ml. La suspensión glomerular fue cultivada en placas de 24 pocillos (5×10^3 glomérulos/pocillo) y mantenidas a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂ en un incubador New Brunswick Scientific (Hertfordshire, Inglaterra, UK).

Los sobrenadantes fueron recogidos a las 24 horas de cultivo y valorado su contenido en TNF α por medio de un ensayo de bioactividad (apartado 3.5.4).

3.4.6. Preparación de la membrana basal glomerular

El aislamiento de la membrana basal glomerular se realizó básicamente como describen Bowman y col. [1983]. Partiendo de riñones de ratas BN descapdulados y previamente eliminada la médula, se desmenuzaron las cortezas renales en tampón fosfato salino (PBS) frío. A continuación se tamizaron a través de un poro de 0,106 mm de diámetro. El tamizado obtenido (que contenía los glomérulos renales) se sometió a 3 lavados en PBS frío realizando centrifugaciones de 5 min a 1.000 rpm. Después de cada centrifugación se eliminó el sobrenadante procurando no subcionar los glomérulos que quedan en el fondo del tubo. Tras el último lavado se eliminó totalmente el PBS y se resuspendió en cloruro sódico (ClNa) 1M para ser sonicadas

las muestras como se explica en el apartado 3.4.7, y posteriormente liofilizadas según se especifica en el apartado 3.4.8.

Antes de su utilización, la MBG se solubilizó sometiéndola a una digestión con colagenasa tipo I (Sigma) (Sigma Chemical Co., St Louis, MI, USA) al 0,7% (p/p) durante 1 hora a 37°C de temperatura.

3.4.7. Sonicación de las muestras de proteínas

Las soluciones de MBG obtenida en el apartado 3.4.6, una vez resuspendido en ClNa 1M, se sometió a 6 ciclos de disrupción por sonicación de 1 min de duración cada ciclo, manteniendo en todo momento las muestras en hielo.

El homogeneizado obtenido se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min. El precipitado se volvió a resuspender en ClNa 1M y se sometió a una nueva centrifugación. Por último el precipitado se resuspendió en un volumen adecuado de H₂O destilada.

3.4.8. Liofilizado de las muestras de proteínas

Las liofilizaciones se realizaron en un liofilizador marca Virtis, modelo 10-030 (The Virtis Company, Inc. Gardiner, NY, USA).

Las muestras de MBG obtenidas del apartado 3.4.7 se colocaron en recipientes de cristal de 150 ml de capacidad (Afora, Madrid, España) y fueron congeladas en

acetona saturada de nieve carbónica. La congelación se llevó a cabo inclinando el recipiente de cristal, procurando que la muestra ocupara la mayor superficie posible.

3.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.5.1. Cuantificación de proteínas

3.5.1.1. Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares

El cálculo de la concentración de MBG una vez solubilizada se determinó según la fórmula propuesta por Kalb y Bernolhr [1977] para extractos celulares:

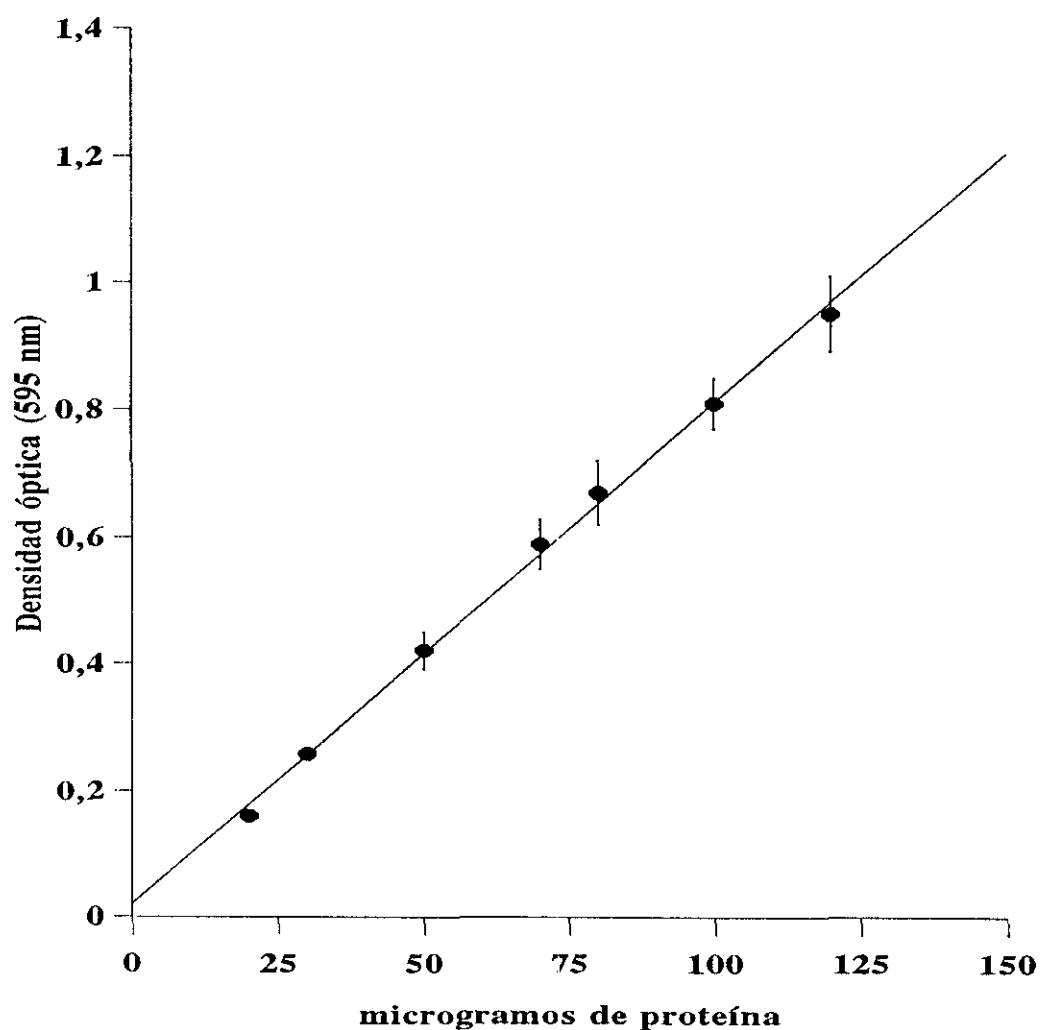
$$\mu\text{g proteína/ml} = 183 A_{230} - 75,8 A_{260}$$

donde A_{230} y A_{260} son las absorvancias de la solución a 230 y 260 nm, respectivamente. Estas se midieron en un espectrofotómetro a tres diluciones diferentes, realizándose tres mediciones para cada una de las diluciones. La concentración utilizada sería la media de todas ellas.

3.5.1.2. Determinación de la concentración de proteína por el método colorimétrico de Bradford

La cantidad de proteína existente en las muestras de orina se cuantificó empleando el método colorimétrico de Bradford como previamente se describe [Bradford, 1976]. Todas las muestras de orina se midieron por triplicado, diluyéndolas en agua destilada cuando procedía. La densidad óptica (DO) se midió en un

espectrofotómetro Titertek Multiskan Plus (Flow) a 595 nm. Para llevar a cabo la valoración de las muestras se hizo una recta patrón, que se recoge en la Figura 3.1, en la que se utilizaron distintas diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) partiendo de una concentración conocida de proteína. La fórmula de la recta obtenida se indica también en la figura.



$$y = 0.789748x + 0.091169$$
$$r^2 = 0.997407$$

para $n = 7$
 x = densidad óptica a 595 nm
 y = μg proteína/pocillo

Figura 3.2. Recta patrón de la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford. La recta patrón se obtuvo a partir de los valores de absorción a 595 nm de distintas diluciones de BSA con concentración de proteína comprendida entre 0 y 120 μg , tratadas según el método colorimétrico descrito por Bradford [1976]. En la figura también se indica la fórmula de la recta obtenida.

3.5.2. Ensayos inmunoenzimáticos

3.5.2.1. Niveles séricos de anticuerpos contra componentes antigénicos de la membrana basal glomerular

Los niveles séricos de anticuerpos contra la MBG se determinaron mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) basándonos en lo previamente descrito por Bowman y col. [1983], e introduciendo algunas modificaciones.

Se cubrieron placas de 96 pocillos con fondo en "U" (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 100 μ l/pocillo de MBG solubilizada de rata (obtenida según el método descrito en el apartado 3.4.6) a una concentración de 10 μ g/ml en tampón carbonato sódico 0,1M (pH 9.6), incubándose durante 16 horas a 4°C. La unión inespecífica se bloqueó incubando la placa durante 1 hora a 37°C con PBS que contenía un 1% de BSA. Los sueros a ensayar se diluyeron a 1/100 en tampón de dilución, compuesto por PBS que contenía 0,05% de monolaurato de polietilén-sorbitán Tween 20) (Sigma) y 1% de BSA. Las placas fueron incubadas con los sueros, durante 1 hora, en estufa a 37°C, tras lo cual se cubrió cada pocillo durante 1 hora a la misma temperatura con un anticuerpo policlonal de conejo conjugado con peroxidasa específico para la IgG de rata (Serotec) a un factor de dilución de 1/1.000. Todos los pasos seguidos fueron precedidos por tres lavados sucesivos de las placas con una solución de PBS que contenía 0,05% de Tween 20.

La actividad peroxidasa se reveló con una solución de diclorido de orto-fenildiamina (OPD) (Sigma) en agua destilada a una concentración de 1 mg/ml que contenía 0,05% de H_2O_2 . Una vez desarrollado el color se detuvo la reacción añadiendo a cada pocillo 25 μ l de ácido sulfúrico (SO_4H_2) 3M.

3.5.2.2. Niveles séricos de anticuerpos contra el ADN monocatenario

La determinación de los niveles circulantes de anticuerpos contra el ADN presente en los animales en estudio se realizó mediante un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio.

Se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en "U" que se cubrieron previamente con poli-L-Lisina (Sigma) a una concentración de 10 μ g/ml en PBS para evitar la unión inespecífica del ADN a la placa. Esta solución se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se cubriría con 2,5 μ g/ml de ADN monocatenario tipo I de timo de ternera (Sigma) en PBS, manteniéndose con dicha solución durante 16 horas a 4°C. Para bloquear la unión inespecífica de los sueros a la matriz de ADN las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con PBS que contenía un 0,05% de Tween 20 y 2% de BSA. Los sueros cuya cuantificación debía realizarse se utilizaron a un factor de dilución de 1/100, añadiéndose 100 μ l a cada uno de los pocillos e incubándose a 37°C por 1 hora. A partir de este punto, la técnica empleada fue la misma que la seguida en apartado 3.5.2.1.

3.5.3. Interpretación de los ensayos inmunoenzimáticos

En cada una de las placas ensayadas se incluyó tanto un suero negativo, obtenido a partir de una mezcla de sueros de un grupo de ratas BN sanas sin tratamiento previo, y un antisuero positivo, procedente de la mezcla de sueros de ratas que habían recibido previamente el tratamiento con Cl₂Hg y sangradas el día 13 de la enfermedad. El ensayo de cada una de las muestras séricas se realizó por cuádruplicado y la DO se midió a 492 nm en un espectrofotómetro Titertek Multiskan Plus (Flow).

Los resultados de ambos ensayos, tanto para la MBG como para el ADN, se expresan como el porcentaje de unión con respecto al valor obtenido del antisuero positivo (día 13 de enfermedad), considerando este valor como el 100% de unión positiva, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ unión positiva} = \frac{A_{495} (\text{suero muestra})}{A_{495} (\text{antisuero positivo})} \times 100$$

donde A₄₉₅ es la absorvancia de la muestra a 495 nm.

3.5.4. Determinación de la concentración de endotoxina bacteriana

Todas las muestras de sobrenadante y suero que fueron ensayadas para determinar la concentración de TNF (apartado 3.5.5) se sometieron a un ensayo de detección de endotoxina bacteriana por medio del ensayo de *Limulus ameobocyte*

(L.A.L.) (Whittaker/M.A.) [Leving y Bang, 1968].

La técnica está basada en la capacidad de la endotoxina para catalizar la activación de un proenzima del lisado de amebocitos [Young y col., 1972]. El grado de activación lo determinaría la concentración de endotoxina presente. El enzima activado hidroliza enlaces específicos de una proteína coagulígena del lisado, produciendo un coágulo que indica la presencia de endotoxina en las muestras ensayadas.

Se realizaron diluciones seriadas de endotoxina estándar (Pierce, Rockford, IL, USA) que sirvieron como control positivo y que abarcaban el rango de sensibilidad del lisado (0.5 U.E./ml a 0.03 U.E./ml) (1 U.E., unidad de endotoxina, equivale aproximadamente a 0.1 ng/ml de endotoxina de *E. coli*). En el ensayo se incluyó también agua apirógena como control negativo. Las muestras a ensayar fueron diluidas desde 1:2 a 1:64. Todo el ensayo se realizó por cuadruplicado.

A 0.1 ml de endotoxina, muestra o agua, se le añadió 0.1 ml de lisado de *Limulus*. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora. Una vez realizada la incubación se calcularon los logaritmos decimales de las diluciones límite de endotoxina de cada una de las curvas, siendo dichas diluciones la última concentración de endotoxina que muestra reacción con el lisado. El antilogaritmo decimal de la media aritmética de los logaritmos nos dará la sensibilidad del lisado (0.1 U.E./ml).

La cuantificación de endotoxina en las muestras se calculó realizando igualmente el logaritmo decimal de la dilución límite y la media aritmética para cada una de las muestras. El antilogaritmo decimal de esta media nos da la sensibilidad del lisado y la concentración aproximada de endotoxina se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de endotox. (U.E./ml)} = \text{sensibilidad del lisado} \times \text{dilución límite}$$

El límite de sensibilidad de este ensayo era de 10 pg/ml.

3.5.5. Cuantificación de la concentración de TNF.

La existencia de actividad TNF se valoró en los sobrenadantes procedentes de células glomerulares en cultivo (apartado 3.4.6.3), así como en muestras de suero. Su concentración se determinó de acuerdo al método previamente descrito [Green y col., 1984]. Se realizó un ensayo de viabilidad sobre la línea celular L929 (procedente originalmente de tejido conectivo de ratón) (ATCC, Rockville, MD, USA) sobre cuyas células el TNF tiene capacidad citotóxica [Aggarwal y col., 1985]. Las células L929, en fase de crecimiento exponencial, fueron resuspendidas en medio de Eagle modificado de Dubelcco (DMEM) (Whittaker) suplementado con un 10% de STF, 1% de antibiótico y glutamina y cultivadas en placas de 96 pocillos (3×10^4 células/pocillo) a 37°C y 5% de CO₂. Veinticuatro horas después fueron añadidas las muestras a ensayar incubándose en presencia de actinomicina D a una concentración de 1 µg/ml. La dilución empleada para el ensayo con sobrenadantes fue de 1/2 y 1/10 hasta 1/1000

para muestras séricas. Cada muestra se valoró por triplicado. Después de 24 horas de cultivo fueron añadidos a cada pocillo 25 μ l de MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium) (Sigma) de una solución de 5 mg/ml. Tras incubar 4 horas a 37°C fue eliminado el medio de cultivo y se añadió a cada pocillo 200 μ l de una mezcla 1:1 de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) y etanol para solubilizar los cristales de azul de formazán. Por último se leyó la densidad óptica de cada muestra en un espectrofotómetro Titertek Multiskan Plus (Flow) a 595 nm.

Simultáneamente se realizó un estudio de neutralización para lo cual se añadió anticuerpo anti-TNF α (Genzyme) o suero control a una concentración final de 5% (v/v) a pocillos que contenían 400 pg/ml de TNF α rh (concentración capaz de lisar el 50% de 3×10^4 células L929 en nuestros experimentos) o a las muestras a ensayar.

En cada uno de los ensayos realizados se incluyó una dilución semilogarítmica de TNF recombinante humano, cuya reactividad con rata ha sido previamente demostrada [Phan y col., 1992] (con una actividad específica de 2×10^7 a 2×10^9 U/mg) (Genzyme) en un rango desde 200 μ g/ml a 1 pg/ml con el fin de realizar la curva patrón que nos permitiera el cálculo de la cantidad de TNF existente en nuestras muestras. La concentración de TNF en las muestras fue extrapolada de la curva patrón obtenida, expresándose los resultados en pg/ml.

3.5.6. Análisis de leucocitos de sangre periférica

3.5.6.1. Recuento de leucocitos periféricos

Parte de la muestra de sangre obtenida como se explica en el apartado 3.4.3 fue procesada para el recuento total del número de leucocitos. El número de células blancas totales se determinó utilizando un Technicon H-1 System (Tarrytown, NJ, USA).

3.5.6.2. Análisis por citometría de flujo

3.5.6.2.a. Marcaje directo: Los porcentajes de linfocitos T y B y sus subclases, así como los porcentajes de células periféricas activadas (Ia^+), se analizaron por medio de un citómetro de flujo. Para ello se tomaron alícuotas de 100 μ l de la muestra de sangre heparinizada a una concentración de 10^7 células/ml, para su marcaje con AcMs conjugados con FITC. Una alícuota de cada muestra se incubó con cada uno de los AcM en estudio durante 10 minutos, preservándolas de la luz y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo los eritrocitos fueron lisados, se fijaron los leucocitos y se estabilizaron las membranas celulares en un Q-PREP (Coulter Immunology, Hialeach, FL, USA). Tras intensivos lavados con HBSS, se resuspendieron en esta misma solución y se analizaron las células marcadas en un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Para este estudio se utilizaron AcM conjugados con fluoresceína (Serotec) a un factor de dilución de 1/20.

3.5.6.2.b. Marcaje indirecto: En el caso de AcM no disponibles en su forma conjugada con FITC se realizó un marcaje indirecto para el análisis por citometría de flujo, por lo que se partió de muestras de sangre periférica que previamente fueron sometidas a un lisado de eritrocitos (apartado 3.4.4). Una vez obtenida la muestra de leucocitos circulantes libre de eritrocitos se partió de una suspensión celular de 10^7 células/ml en HBSS. Se hicieron alícuotas de $100\ \mu\text{l}$ (10^6 células/alícuota) y se incubó en hielo durante 30 minutos con el AcM correspondiente a una dilución 1/10 ó 1/20, según el caso. Todas las muestras se lavaron con HBSS tres veces centrifugando 10 min a 1.400 rpm. Una vez resuspendidas las muestras en el volumen inicial ($100\ \mu\text{l}$) se incubaron con un AcM conjugado con FITC específico para ratón (Serotec), puesto que nuestros monoclonales están hechos en ratón. La incubación también se realizó en hielo y en la oscuridad por un período de 30 min, para después proceder a los lavados con HBSS (tres en total). Las muestras se resuspendieron en $300\ \mu\text{l}$ de HBSS y se analizaron las células marcadas con fluoresceína en el FACScan (Becton Dickinson).

3.6. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

3.6.1. Estudio histológico

3.6.1.1. Hematoxilina-Eosina

Los cortes procesados como se explica en el apartado 3.4.6.1 se incluyeron durante 10 minutos en hematoxilina de Carazzy para después pasar a un baño de

eosina alcohólica durante 30 segundos. Tras deshidratar el tejido e incluir las preparaciones en un baño de xilol, se montaron con un medio no acuoso (DPx, Raymond Lamb, London, Inglaterra).

3.6.1.2. Ácido periódico de Schiff's (PAS)

Las preparaciones, obtenidas como se describe en el apartado 3.4.5.1, se incluyeron en ácido periódico al 0.5% durante 10 min. Tras lavar durante 10 min en agua corriente se realizó una incubación de 10 min en Reactivo de Schiff's y posteriormente 5 min en bisulfito sódico al 2%. Después de lavar en agua durante 10 min se contrastaron los núcleos con hematoxilina de Carazzy y se montaron con DPx (Raymond Lamb) después de lavar y deshidratar el tejido del modo habitual.

3.6.2. Estudio inmunohistoquímico

3.6.2.1. Inmunofosfatasa indirecta

El método de inmunofosfatasa indirecta fue empleado para caracterizar el infiltrado celular con el siguiente panel de AcMs, todos ellos hechos en ratón: OX1, OX6, OX8, OX19, OX33, W3/25, ED1 y HP2/1 descritos en la tabla 3.1.

La técnica se realizó básicamente como describen Cordell y col. [1984]. Utilizando las muestras congeladas de tejido renal, cuyo proceso se especifica en el apartado 3.4.5.2, se hicieron cortes de 5 μ m con un criostato. Las secciones se dejaron secar durante toda la noche al aire para después fijarlas en acetona durante 10

minutos. Después de lavar 3 veces en tampón tris salino (TBS) (Tris-ClH 10 mM, pH 7.3/CINa 0,15M), se incubaron los cortes con los diferentes AcMs empleando un factor de dilución de 1/10 a 1/1.000, según el AcM, durante 30 minutos en cámara húmeda. Se lavaron las preparaciones 3 veces en TBS y se incubó con el anticuerpo secundario durante 30 minutos, en nuestro caso un anticuerpo policlonal de conejo conjugado con fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (FAAFA) que reconocía ratón (Dako Ltd., Bucks, Inglaterra), diluido 1/60 en TBS. Después de 10 minutos de lavado se procedió a revelar la FAAFA: se preparó una solución que contenía 5 mg de naftolasa fosfato (Sigma) disuelto en 0,2 ml de dimetilformamida a pH 8.2, y una segunda solución que contenía 5 mg de Fast Red TR (Sigma) en 10 ml de acetato de veronal tamponado y 5mg de levamisole. La solución sustrato se preparó siempre en el momento de su uso, filtrándola previamente. Una vez mezcladas ambas soluciones se incubaron los cortes de tejido de 10 a 30 minutos, para después lavar en H₂O destilada y contrastar durante 2 minutos con hematoxilina de Carazzy. Una vez teñidas las preparaciones se montaron en medio acuoso (gelatina de Kaiser).

3.6.2.2. Inmunofluorescencia directa

Para la detección de depósitos glomerulares de IgG de rata se recurrió a la técnica de inmunofluorescencia directa [Mampaso y col, 1989]. Partiendo de secciones de 5 μ m de tejido renal congelado que se dejaron secar al aire durante toda la noche, fueron fijadas en una solución de alcohol etílico/eter dietílico (1:1, v/v) durante 10 minutos. Se lavaron las preparaciones tres veces en PBS, seguido de una incubación de 1 hora con un anticuerpo policlonal de conejo conjugado con FITC, específico para

la IgG de rata, en cámara húmeda y protegido de la luz. Después de lavar con PBS los cortes se montaron en medio acuoso (Aquatex, Merk) y se observaron en un microscopio de fluorescencia Leitz (E. Leitz Inst., Wetzlar, Alemania) equipado con lámparas de mercurio HB-200 y un sistema de filtros que incluía un filtro BG-TB, otro para luz ultravioleta y un tercero de barrera, Leitz K-510.

3.7. CUANTIFICACION DEL INFILTRADO

3.7.1. Infiltrado intersticial y perivascular

La cuantificación del número de células positivas del infiltrado intersticial y perivascular para los distintos marcadores empleados se realizó con un microscopio de luz convencional, empleando un objetivo de 63X. El recuento de células positivas para cada uno de los anticuerpos estudiado se realizó en dos cortes de tejido renal para cada una de las ratas y días, eligiendo al azar 10 áreas con infiltrado celular y determinándose la media para todos los animales.

3.7.2. Infiltrado glomerular

Para cuantificar el número de células que infiltraban los glomérulos se escogieron igualmente dos cortes por rata y día para cada marcador estudiado y se hizo el recuento en 20 glomérulos por corte. Los valores obtenidos se expresan en número de células/glomérulo.

3.8. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó por medio de una prueba "t" de Student, para muestras de $n < 30$, aplicando la corrección de Bon Ferroney para múltiples comparaciones. Para el análisis de los resultados del estudio de sangre periférica e infiltrado se eligió la prueba de Wilcoxon para dos muestras, por tratarse de muestras no paramétricas.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CINETICA DE LA ENFERMEDAD

4.1.1. Proteinuria

El desarrollo de la proteinuria en los animales tratados con Cl_2Hg se desarrolló de forma bifásica (Figura 4.1). En un primer momento pudo apreciarse un aumento transitorio de los niveles de proteínas en orina que tenía una duración de 24 a 48 horas y que se evidenciaba inmediatamente después de la administración de la primera dosis de Cl_2Hg .

Una vez superada esta etapa los niveles de proteínas en orina volvían a sus valores basales, los cuales oscilaban entre los 2 y los 20 mg/24 horas, dependiendo del animal. A partir de este momento el rango nefrótico de proteinuria se hacía evidente el día 11 de enfermedad, alcanzando los niveles máximos alrededor de los días 13-15 ($134,46 \pm 32,12$ mg/24 h) para, posteriormente, comenzar un descenso progresivo aproximadamente el día 16, hasta recuperar de nuevo los niveles basales llegado el día 23 ($23,09 \pm 3,00$ mg/24 h).

4.1.2. Histopatología renal

4.1.2.1. Lesión tubular

Las lesiones más precoces se observaron ya a las 24-48 horas después de la administración de la primera dosis de mercurio. Esta lesión consistía únicamente en

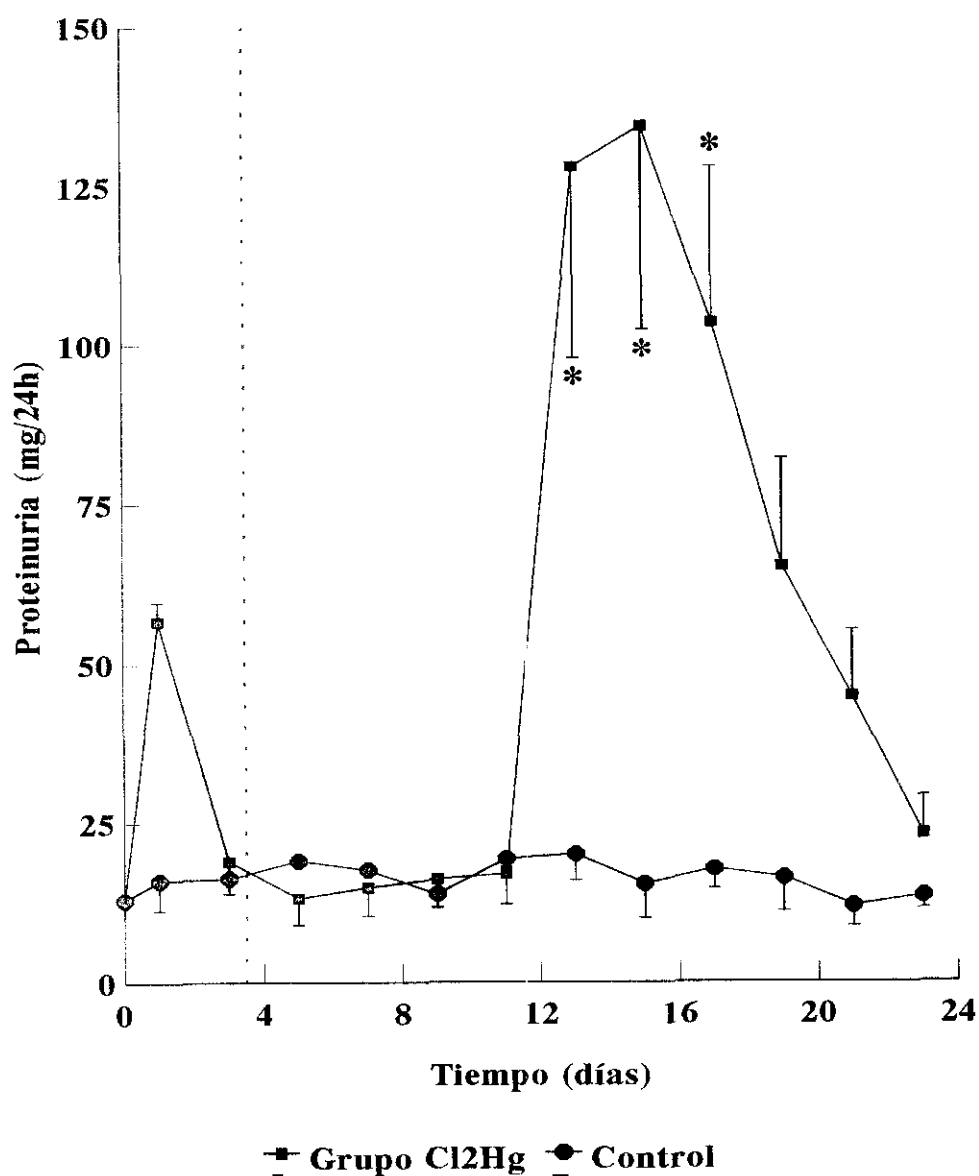


Figura 4.1. Cinética de la excreción de proteínas en orina del grupo de animales tratados con Cl₂Hg. Se compara dicho grupo con el Grupo Control (inyectado con H₂O a pH 3.8). El pico que se observa a la izquierda de la línea punteada representa la proteinuria debida al daño tóxico directo que ejerce el mercurio sobre el túbulo renal. Los valores representados corresponden a la media \pm DE de n=25 animales para el Grupo Cl₂Hg y n=10 para el Grupo Control. *p<0.003.

una degeneración de las células epiteliales del túbulo renal que se evidenciaba por la frecuente vacuolización de dichas células, así como tumefacción y necrosis celular como indicaba la frecuencia de núcleos picnóticos (Figura 4.2A). Desde las 48 horas de enfermedad podían apreciarse también numerosas figuras mitóticas que persistían hasta el día 5 (Figura 4.2B). Este daño tubular, causante del pico inicial de proteinuria (Figura 4.1), se apreciaba hasta el día 6 de enfermedad, momento en el que el túbulo renal mostraba ya una estructura totalmente normal.

Una vez regenerado el túbulo no se observaron más alteraciones en la estructura intrínseca del riñón durante el desarrollo de la enfermedad y hasta su resolución espontánea. Desde el día 6, y a nivel de microscopía óptica, sólo pudo verse la aparición de infiltrado celular y depósitos glomerulares de anticuerpos dirigidos contra la MBG.

4.1.2.2. Infiltrado celular intersticial

La primera valoración de la existencia de infiltrado celular nos la proporcionó el examen mediante microscopía óptica del tejido renal procesado como se especifica en el apartado 3.4.5.1 y utilizando las técnicas de H&E y PAS previamente explicadas en Material y Métodos (apartados 3.6.1.1 y 3.6.1.2, respectivamente).

La localización de este infiltrado era esencialmente perivascular, apreciándose grandes concentraciones de células circulantes rodeando los vasos del tejido renal. Además, podía observarse un acúmulo de células invadiendo el intersticio renal, que

en algunos animales era muy intenso. El infiltrado comenzaba a desarrollarse a partir del día 8, evidenciándose, en un principio, una distribución periglomerular de las células hematopoyéticas que invadían el riñón (Figura 4.3A). El número de estas células se pronunciaba al llegar el día 13, apareciendo ya una acumulación celular muy considerable (Figura 4.3B). A partir de este día, el infiltrado comenzaba a disminuir paulatinamente, observándose un descenso el día 23, aunque manteniendo aún cierto grado de infiltración en las biopsias correspondientes al día 32 de la enfermedad.

4.1.2.3. Infiltrado celular glomerular

Debido a las escasas células que normalmente infiltran el glomérulo, y a la dificultad añadida dadas las características histológicas de éste que hace difícil identificar células ajenas al propio glomérulo en cortes teñidos con H&E, para la identificación del infiltrado glomerular se realizó un marcaje con un AcM dirigido contra el antígeno leucocitario común (OX1, Serotec) (apartado 3.6.2.1). Así, el examen glomerular reveló una cinética de infiltración muy diferente a la perivascular e intersticial. Se encontraron diferencias significativas el día 4 ($0,92 \pm 0,21$ células/glomérulo) con respecto al día 0 ($0,50 \pm 0,04$ células/glomérulo) y aumentando el día 8 de enfermedad ($2,0 \pm 0,80$ células/glomérulo) (Figura 4.4A). Igualmente, se podía apreciar una acumulación de leucocitos alrededor del glomérulo, muy evidente a día 13, así como un aumento del número de leucocitos infiltrantes, el mismo día, en el propio glomérulo ($1,65 \pm 0,50$ células/glomérulo) (Figura 4.4B).

4.1.2.4. Caracterización del infiltrado celular

4.1.2.4.a. Infiltrado intersticial y perivascular. Una vez comprobada la existencia del infiltrado, así como la cinética que seguía la aparición de estas células en el riñón, pasamos a caracterizar dicho infiltrado celular, proceso que se especifica en el apartado 3.7 de Material y Métodos.

La caracterización del infiltrado intersticial y perivascular se llevó a cabo sobre las biopsias renales correspondientes al día 13 (día de máximo infiltrado). Los resultados de la identificación y cuantificación de las células infiltradas se especifica en la tabla 4.1. Como puede apreciarse en dicha tabla, a día 13 este infiltrado consistía principalmente en monocitos (células ED1⁺) (30-40%) y linfocitos T (células OX19⁺) (70-80%) (Figura 4.5). El hecho de que del 90 al 100% del infiltrado fuera OX6⁺ (Figura 4.6A), esto es, células portadoras del antígeno MHC clase II, evidenciaba su carácter de células activadas. Aproximadamente un 70% de las células T infiltrantes eran W3/25⁺ (linfocitos T cooperadores) (Figura 4.7A), mientras que sólo alrededor de un 30% eran linfocitos T citotóxicos/supresores (OX8⁺) (Figura 4.7B). Los linfocitos B (células OX33⁺) (Figura 4.6B) constituían el menor de los porcentajes de infiltración, no llegando a veces a superar el 10% de éste.

Cuando se analizaron los cortes histológicos con un marcador para la molécula de adhesión VLA-4 (AcM HP2/1) observamos cómo gran parte de las células circulantes que invadían el intersticio renal eran positivas para este marcador (más del 80%), tanto en el caso del infiltrado intersticial como glomerular (Figura 4.8).

Tabla 4.1. Composición del infiltrado perivascular e intersticial en ratas BN tratadas con Cl₂Hg a día 13 de enfermedad.

AcM	Especificidad	% células positivas
OX6	Ag MHC clase II (Ia)	90-100
OX19	Linfocitos T	70-80
ED1	Monocitos y macrófagos	30-40
W3/25	Linfocitos T cooperadores	50-60
OX8	Linfocitos T citotóxicos/supresores	20-30
OX33	Linfocitos B	5-10
HP2/1	Integrina α 4	80-85

La cuantificación del número de células positivas para cada uno de los AcMs se llevó a cabo en n=6 ratas por día y dos cortes de tejido por rata, contándose en cada sección 10 áreas con infiltrado escogidas al azar. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas tomando como 100% el obtenido del recuento de células marcadas con el AcM OX1 (anti-leucocito común).

4.1.2.4.b. Infiltrado glomerular. Puesto que la aparición del infiltrado glomerular tenía una cinética diferente, se caracterizó no sólo sobre biopsias del día 13, sino también en las procedentes del día 4 y 8 de enfermedad (Tabla 4.2). El infiltrado aparecido a día 4 y 8 demostró tratarse de células ED1⁺ en su mayoría. El día 13, por el contrario, pudo apreciarse una disminución del número de células ED1⁺ por glomérulo, aumentando, por otro lado, las células OX8⁺. (Figura 4.9).

Tabla 4.2. Caracterización del infiltrado glomerular durante la nefritis inducida por Cl₂Hg

AcM	Nº de células positivas/glomérulo				
	0	4	8	13	23
OX6	0.40±0.07	0.65±0.15	1.56±0.60*	1.53±0.50*	0.33±0.15
ED1	0.30±0.06	0.67±0.03*	1.30±0.28*	0.50±0.21	0.27±0.10
OX8	0.22±0.07	0.20±0.05	0.17±0.06	0.70±0.10*	0.20±0.03

Para cada día se examinaron 6 ratas, y 2 secciones por rata, contándose 20 glomérulos por corte. Los resultados se expresan como la media ± DE.

* p<0.01.

4.1.2.5. Depósitos glomerulares de inmunoglobulina de rata

El estudio por inmunofluorescencia directa (apartado 3.6.2.2) realizado sobre tejido renal congelado obtenido los días ya mencionados, evidenció, como ya ha sido previamente publicado [Sapin y col., 1977; Aten y col., 1988a], la existencia de depósitos glomerulares de IgG a partir del día 13, apreciándose claramente un patrón lineal de dichos depósitos a lo largo de la membrana basal glomerular (Figura 4.10A). A partir del día 21, y hasta el día 32, aparecía una mezcla de patrón lineal y granular (Figura 4.10B). Por otra parte, los depósitos glomerulares de IgM se mantuvieron lineales a lo largo del curso de la enfermedad.

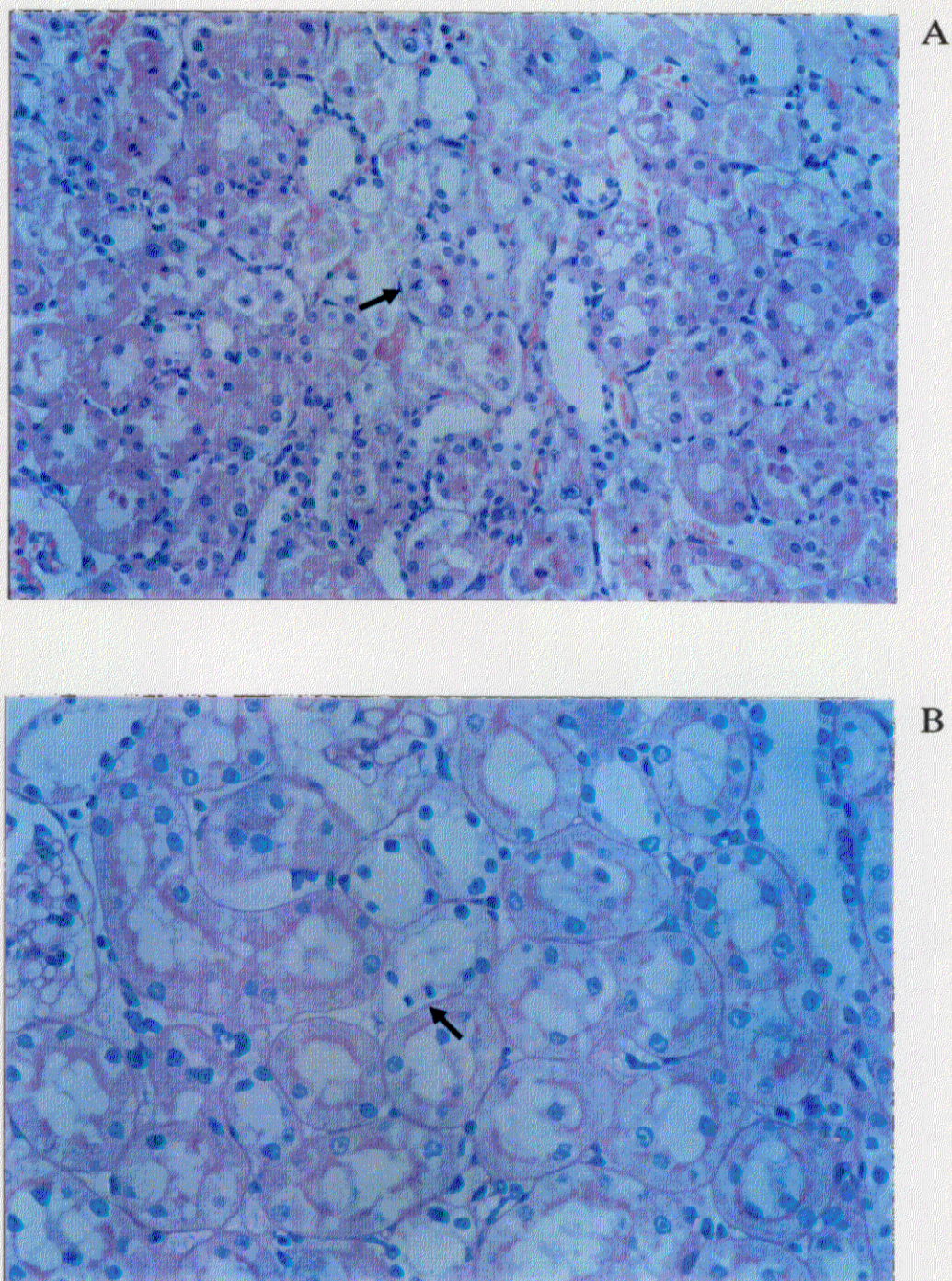
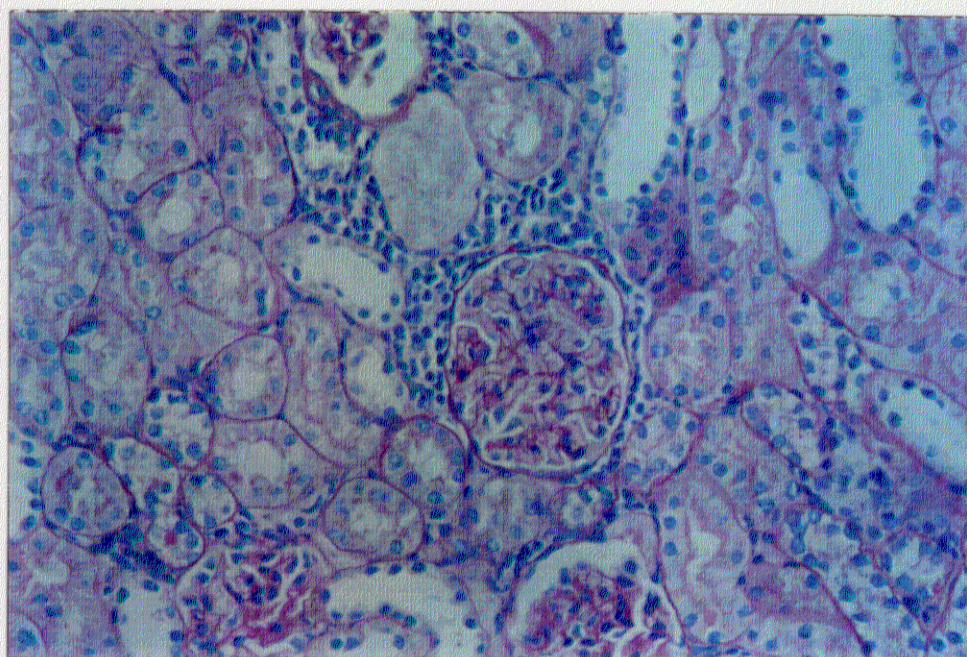
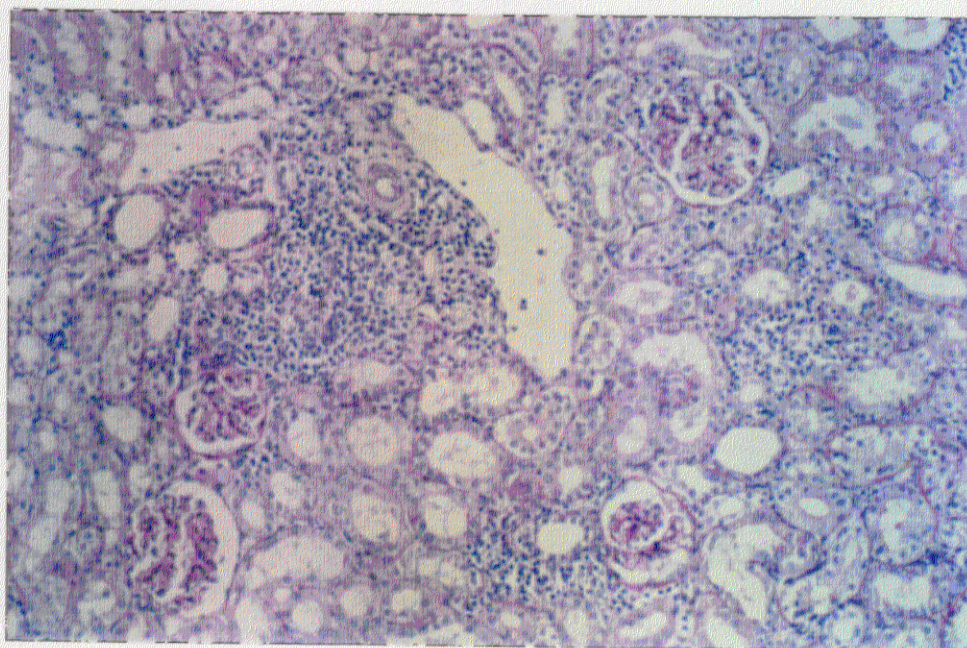


Figura 4.2. Corte renal procedente de una rata del Grupo Cl_2Hg , en los días iniciales del tratamiento. A) Tinción realizada en un riñón 48 horas después de la administración de la primera dosis de Cl_2Hg . Se observa la formación de vacuolas y tumefacción en las células epiteliales del túbulo, así como gran número de núcleos picnóticos, signo de necrosis celular. Aparecen también algunas figuras mitóticas (↑) (PAS x 150). **B)** El día 6 de tratamiento se aprecia ya una gran regeneración del epitelio tubular, aunque aún se observan numerosas células en mitosis (↑) (PAS x 200).



A



B

Figura 4.3. Infiltrado intersticial en el Grupo Cl_2Hg . A) muestra el infiltrado, preferentemente periglomerular, que comienza a aparecer el día 8 de enfermedad (PAS x 180). En B) se aprecia la intensidad que llega a alcanzar el infiltrado, pudiendo observarse ya una importante acumulación de leucocitos en el intersticio renal y en las regiones perivasculares (PAS x 100).

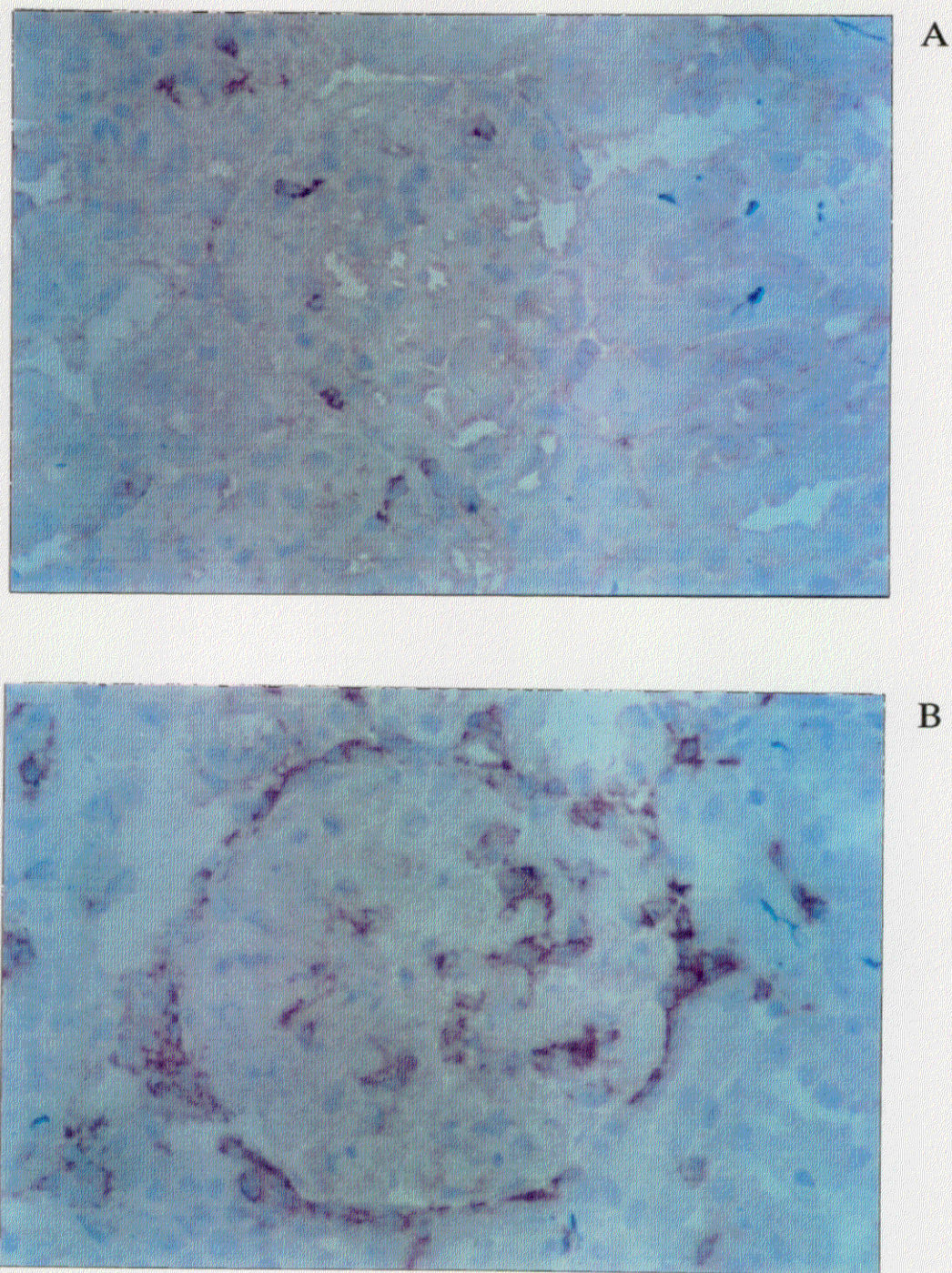


Figura 4.4. Tinción positiva para OX1 (antígeno leucocitario común) en glomérulos de rata del Grupo Cl_2Hg . El día 4 de enfermedad se observa ya algunas células infiltrando el glomérulo (A) (FAAFA x 325), mientras que 13 días después de la primera inyección de Hg, la infiltración es considerablemente mayor (B) (FAAFA x 400).

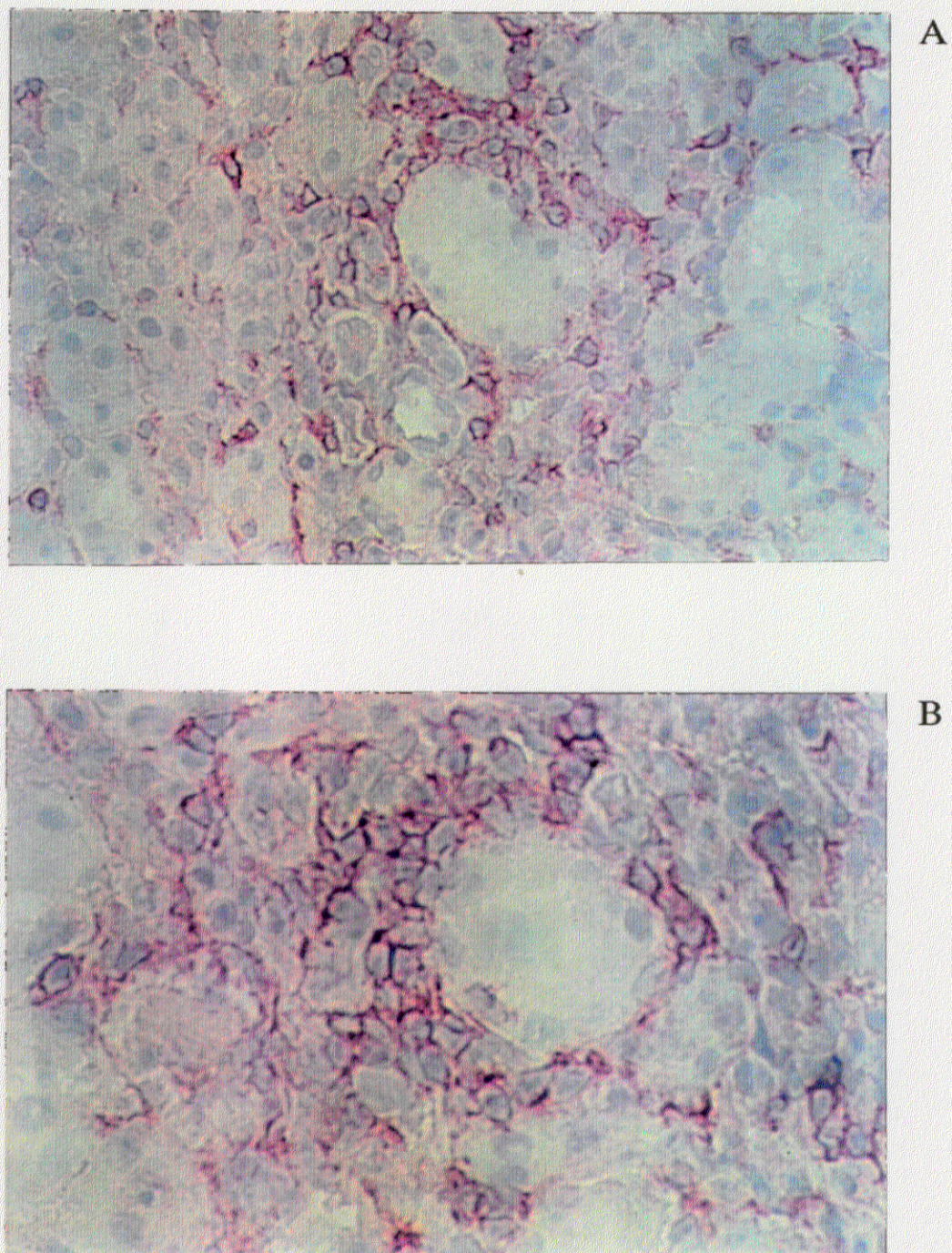


Figura 4.5. Caracterización del infiltrado intersticial y perivascular en el Grupo Cl_2Hg . A) Tinción con el marcador ED1, específico de monocitos/macrófagos. Una proporción considerable de las células infiltrantes mostraban positividad para este marcador (30-40% aproximadamente) (FAAFA x 250). B) La tinción con OX19 permitía apreciar que el grupo más numeroso de células infiltrantes eran células T (70-80%) (FAAFA x 300).

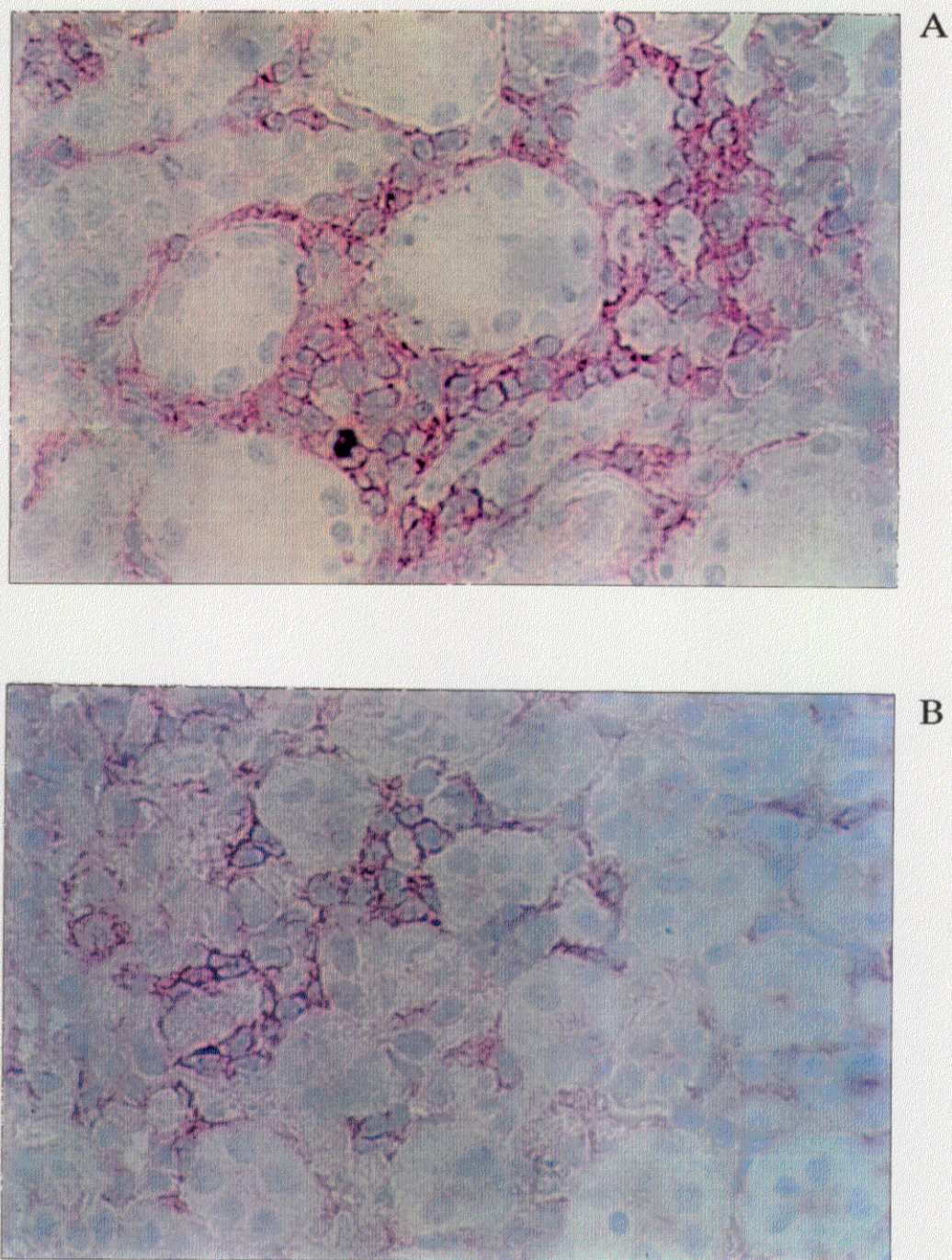


Figura 4.6. Caracterización del infiltrado intersticial en riñones de ratas del Grupo Cl₂Hg. A) muestra la positividad de las células infiltrantes para el marcador OX6. En todos los cortes y ratas analizadas el porcentaje de células positivas para dicho Ac llegaba a ser del 90-100%. B) El menor porcentaje de células lo constituyeron la población de linfocitos B. Como se observa, el número de células OX33⁺ suponían un número escaso, no sobrepasando el 10% del infiltrado. (FAAFA x 300).

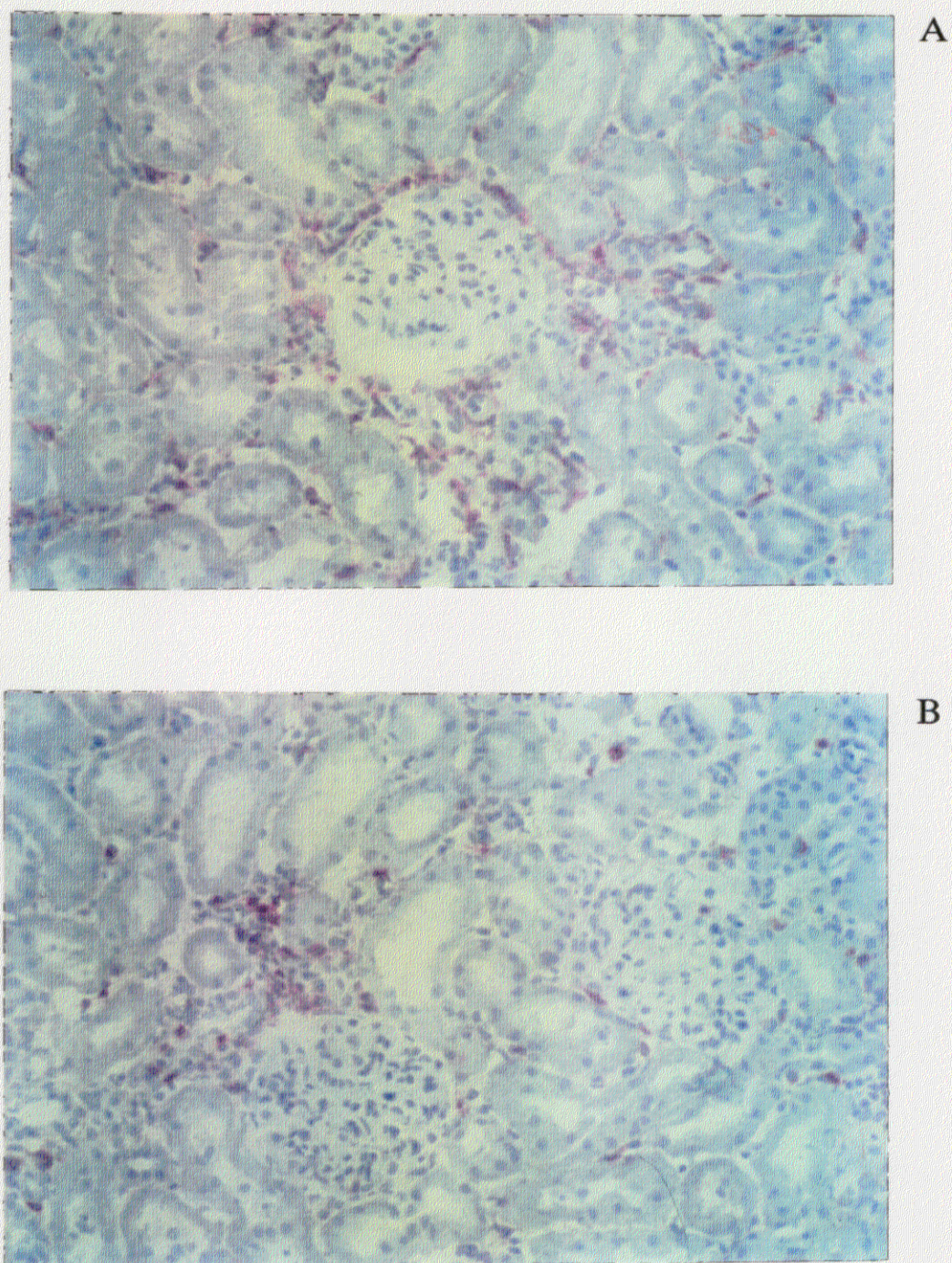


Figura 4.7. Caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T en cortes de tejido renal de ratas tratadas con Cl_2Hg . El mayor número de células lo representaba la subclase de linfocitos T cooperadores (W3/25^+) (A), llegando a constituir una población bastante importante del infiltrado. B) La subpoblación T citotóxica/supresora (OX8^+), aunque importante, era sensiblemente menor. (FAAFA x 180).

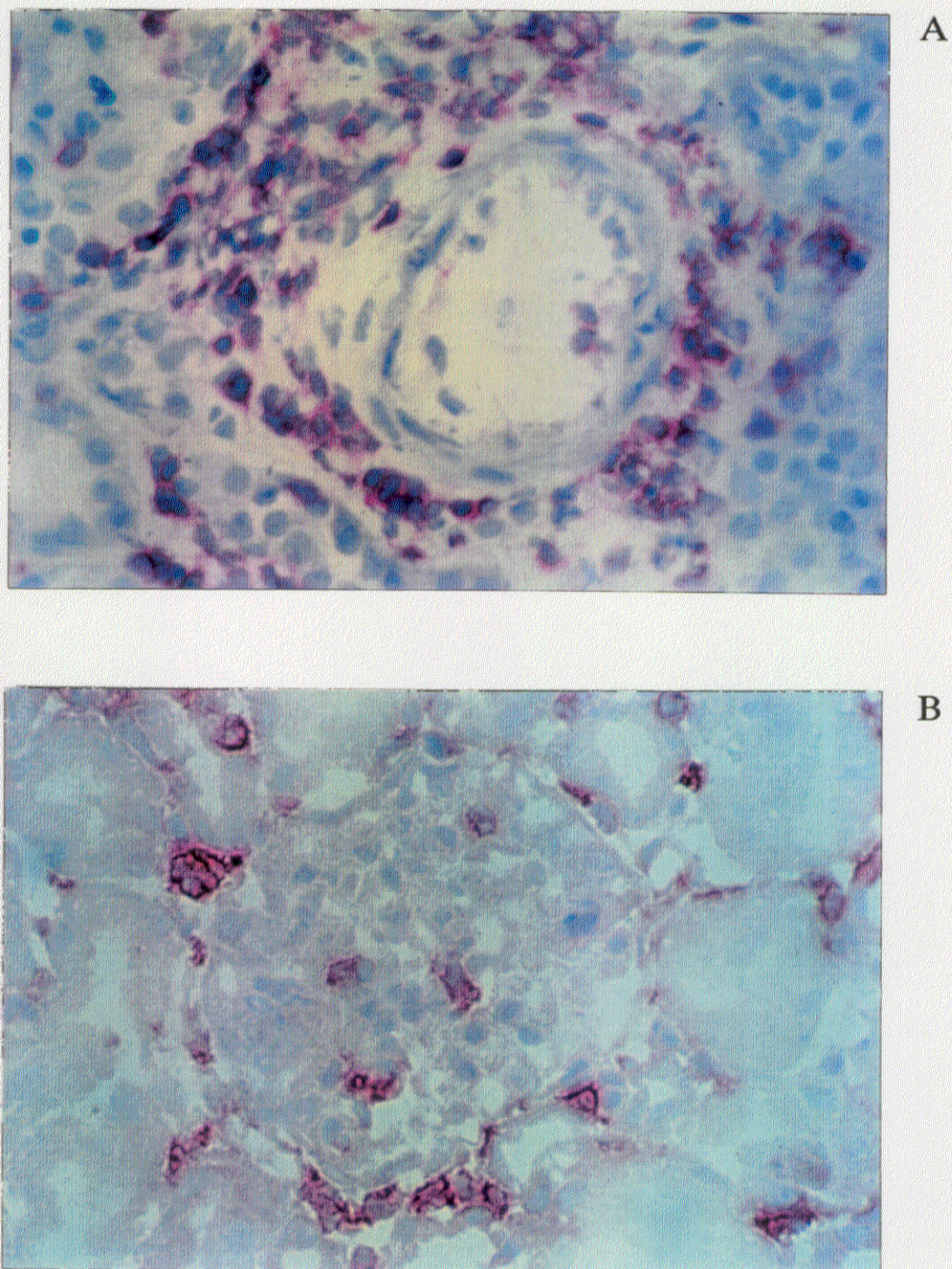


Figura 4.8. Caracterización de las células positivas para el AcM HP2/1. Ambas microfotografías representan la tinción positiva para el Ac HP2/1 (dirigido contra la integrina $\alpha 4$). Se puede apreciar cómo gran parte del infiltrado, tanto intersticial (A) (FAAFA x 300), como glomerular (B) (FAAFA x 400) expresaba la integrina $\alpha 4$.

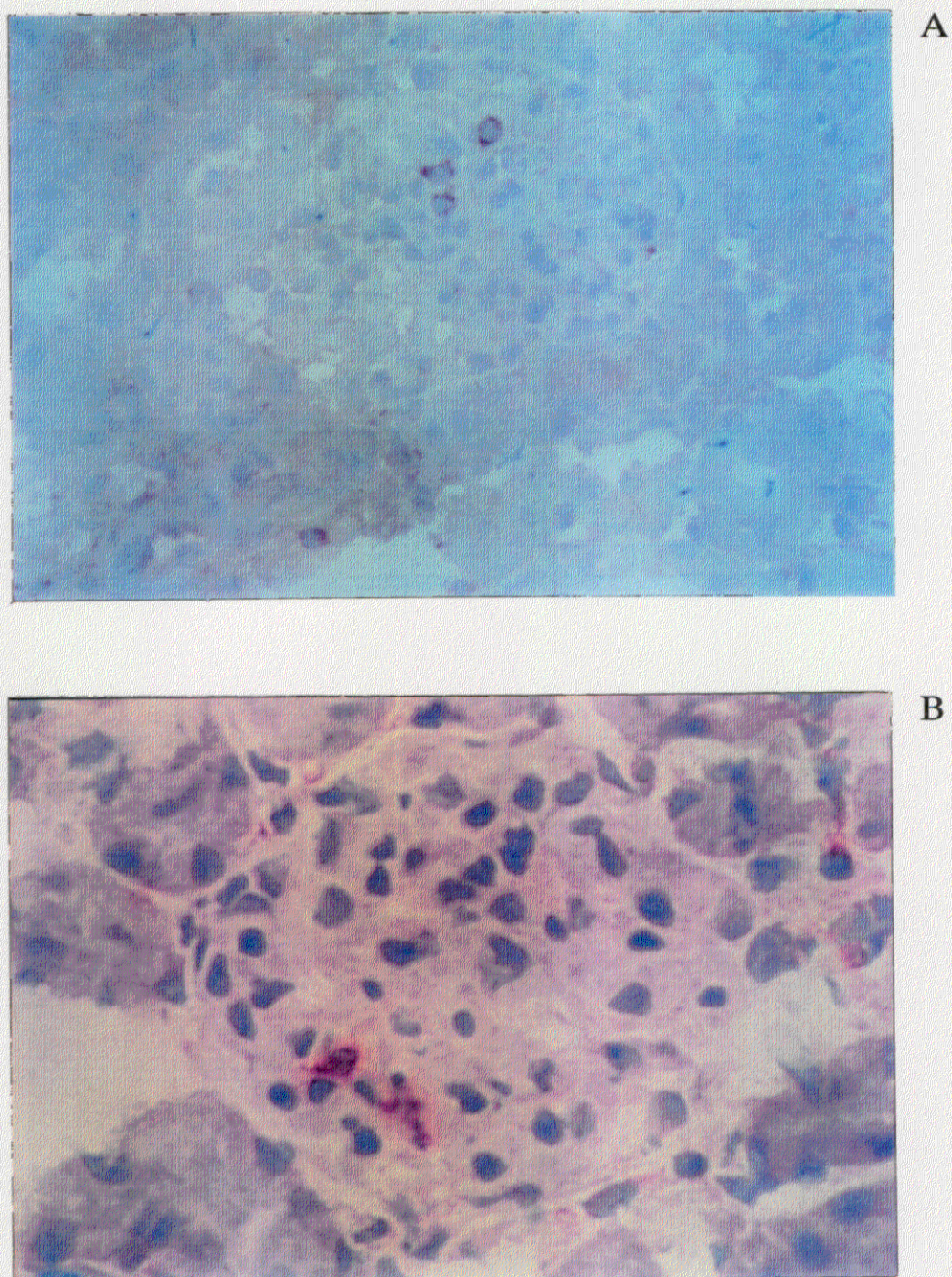


Figura 4.9. Caracterización del infiltrado glomerular del Grupo Cl₂Hg. A) muestra la positividad para el AcMED1 (específico de monocitos/macrófagos de rata) el día 8 de enfermedad, constituyendo la población mayoritaria de leucocitos infiltrantes (FAAFA x 325). B) El día 13 de enfermedad el mayor número de células que infiltraban el riñón eran por el contrario, células OX8⁺ (T citotóxicas/supresoras). (FAAFA x 400).

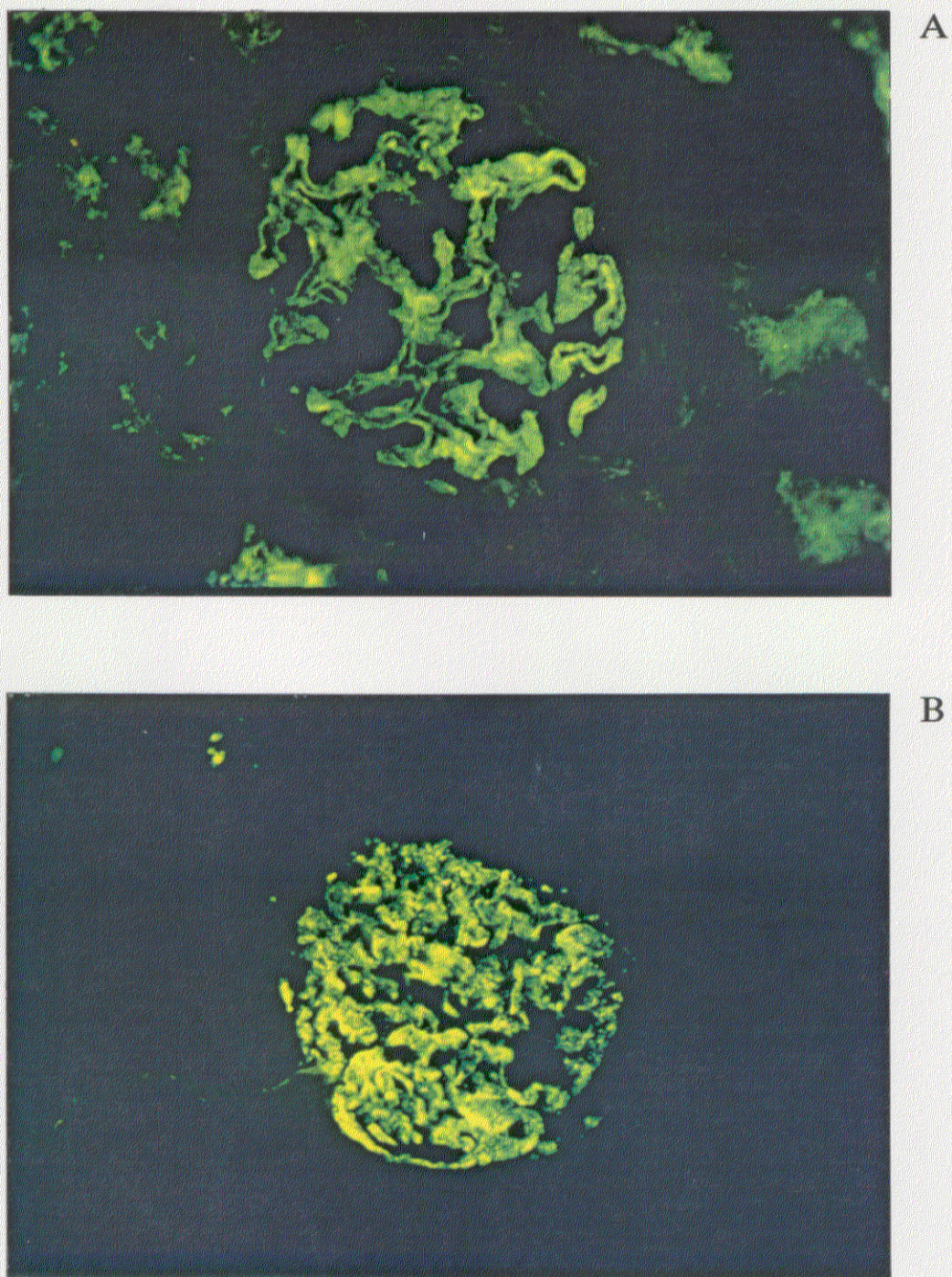


Figura 4.10. Depósitos glomerulares de Ig de rata sobre la membrana basal en el Grupo Cl₂Hg. A) Inmunofluorescencia directa en tejido renal procedente del día 13 de enfermedad mostrando un patrón lineal para la Ig total. B) El día 23 la misma técnica mostraba un patrón mixto. (IF x 325).

4.1.3. Niveles séricos de autoanticuerpos

4.1.3.1. Anticuerpos contra la membrana basal glomerular

Las muestras de suero, obtenidas como se explica en el apartado 3.4.2 de Material y Métodos, fueron valoradas por medio de un ensayo inmunoenzimático (apartado 3.5.2.1) para determinar su contenido en anticuerpos contra la MBG. Estos resultados, expresados como el porcentaje de unión positiva (apartado 3.5.3), revelaron una cinética para la síntesis de anticuerpos contra la MBG muy semejante a la que mostraba la proteinuria. Como puede valorarse en la representación de dicha cinética (Figura 4.11A), a partir del día 8 los niveles de autoanticuerpos en sangre, hasta entonces basales (11% a 25%), comenzaban a aumentar, disparándose a valores máximos después del día 11 y hasta el día 13 ($138,75 \pm 20,50\%$). A partir de este momento experimentará un rápido aclaramiento en sangre hasta recuperar casi por completo los niveles basales llegado el día 23 ($32,30 \pm 2,39\%$).

Como pretende demostrarse en la Figura 4.12A la cinética de la síntesis de anticuerpos contra la MBG precede siempre a la de excreción de proteínas en orina, pudiéndose comprobar que a partir del momento en que los niveles de Acs en sangre disminuyen rápidamente, la cantidad de proteína en orina responderá de igual manera unos días después, si bien lo hará más lentamente.

4.1.3.2. Anticuerpos contra el ADN monocatenario

Como puede apreciarse en la Figura 4.11B la producción de Acs contra el

ADN comienza a aumentar después del día 4, experimentando un rápido ascenso desde el día 8 hasta el 13 ($78,70 \pm 13,90\%$ a $73,05 \pm 9,20\%$). El aclaramiento es, sin embargo, mucho más lento que el apreciado para los autoanticuerpos contra la MBG, y sin recuperar nunca los niveles basales ($38,87 \pm 2,73\%$) [Pusey y col., 1990]. La comparación de la cinética de síntesis de ambos autoanticuerpos (Figura 4.12B) permite apreciar la diferencia existente entre ellas.

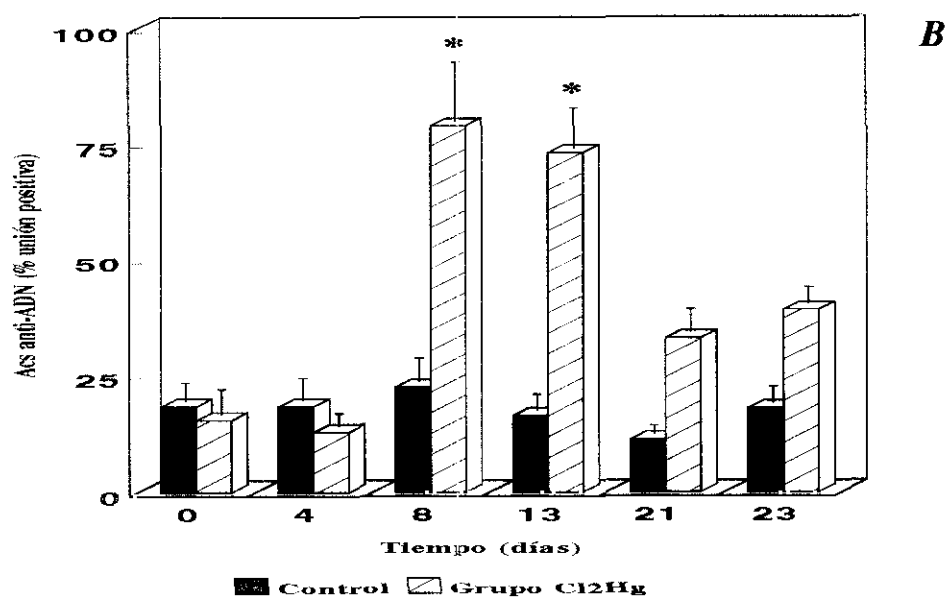
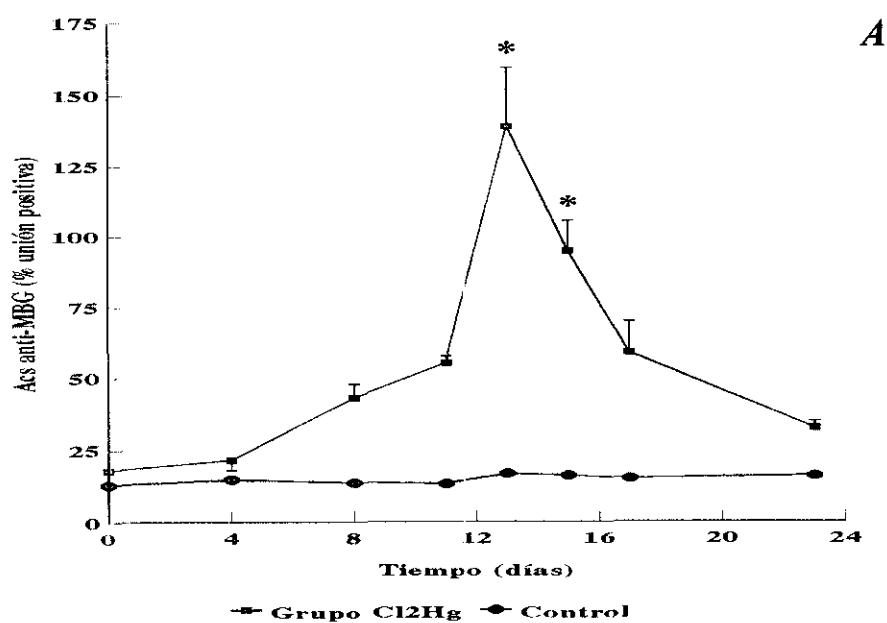


Figura 4.11. Cinética de la secreción de autoanticuerpos del grupo de animales tratados con Cl₂Hg. A) Secreción de autoanticuerpos contra la MBG. La gráfica recoge los porcentajes de dichos Acs en muestras de suero obtenidas en días sucesivos a lo largo del experimento. B) Síntesis de autoanticuerpos contra el ADN en muestras de suero para los días ya señalados. Los porcentajes expresados en la figura se calcularon considerando el 100% de unión positiva la obtenida por un antisuero positivo (apartado 3.5.3). Los valores representados en la gráfica fueron obtenidos de la media de $n=25$ y $n=10$ ratas \pm DE, para el Grupo Cl₂Hg y Control, respectivamente. * $p<0.002$.

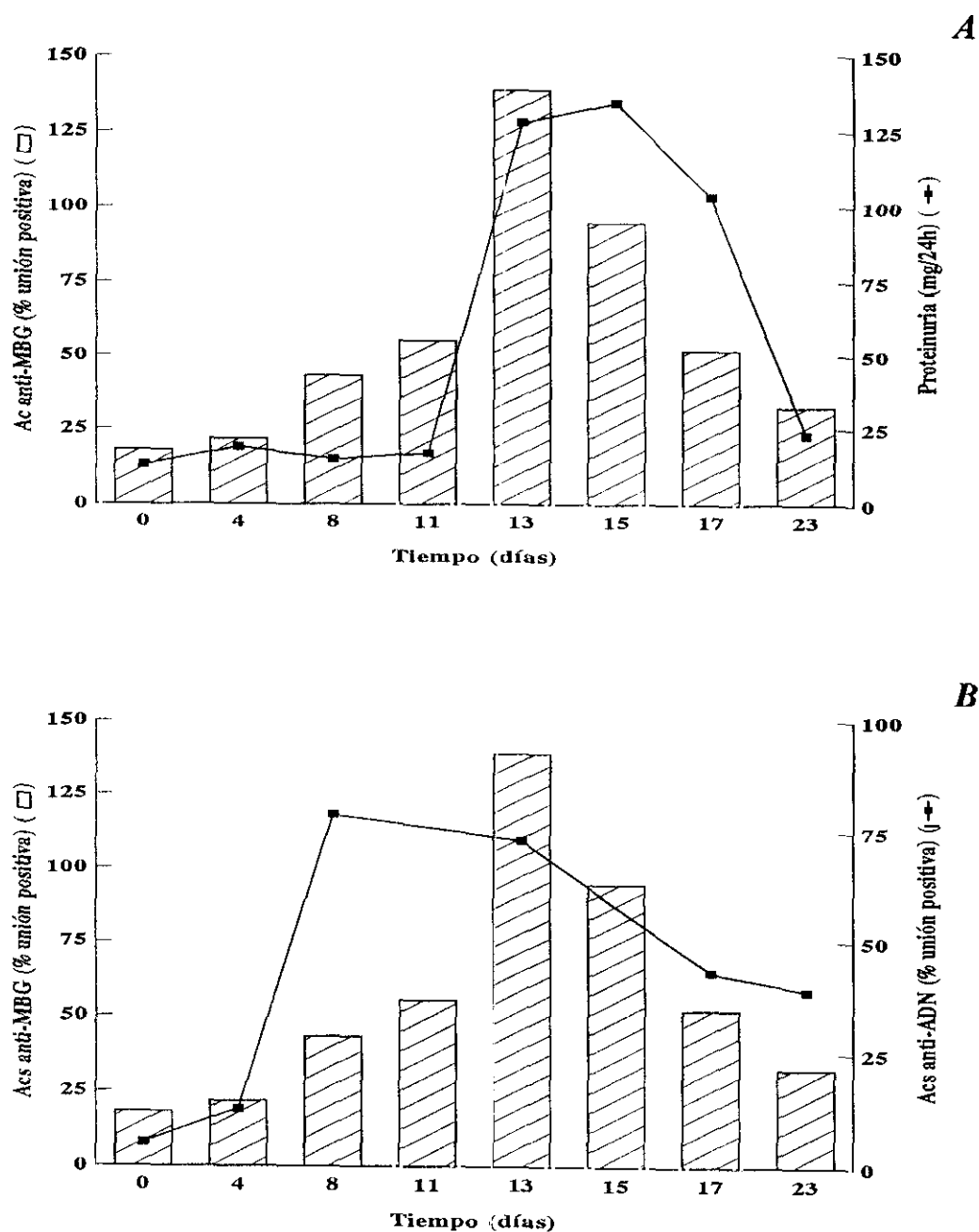


Figura 4.12. Comparación de las cinéticas seguidas por la proteinuria y la secreción de anticuerpos en el Grupo Cl₂Hg. A) Secreción de Acs anti-MBG y proteinuria. Como se puede observar en la gráfica, la secreción de anticuerpos anti-MBG precede al desarrollo de la proteinuria. B) La comparación de las cinéticas de producción de ambos tipos de autoanticuerpos muestra un desarrollo totalmente diferente entre ellas. Las desviaciones y significaciones se representan en las gráficas 4.1 y 4.11.

4.1.4. Estudio de las poblaciones leucocitarias circulantes

El recuento del número total de leucocitos, realizado en días alternativos a lo largo del experimento, no reveló diferencias significativas entre los distintos días estudiados cuando se comparaba con los valores obtenidos del grupo de animales que constituían el control negativo. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 4.13A, el número total de leucocitos en sangre parecía oscilar durante la enfermedad, aunque estas mismas oscilaciones eran detectadas en los controles negativos, del mismo modo que en la sangre de ratas sanas. Se estableció, así, un amplio rango considerado como normal ($4 \times 10^3/\mu\text{l}$ a $8,5 \times 10^3/\mu\text{l}$). El estudio estadístico realizado entre ambos grupos determinó, por tanto, que dichas variaciones no eran significativas, encontrándose siempre dentro de los límites normales.

Cuando se hizo un estudio del porcentaje de células circulantes portadoras del antígeno Ia, se apreció un claro aumento que comenzaba el día 8 y culminaba el día 13. Dicho aumento llegaba a constituir un $67,24 \pm 6,73\%$. El análisis de las variaciones de este mismo marcador en la población linfocitaria reveló que aproximadamente un 67% de las células portadoras de este antígeno correspondían a linfocitos circulantes (Figura 4.13B y C).

El análisis porcentual de las distintas clases de linfocitos y subtipos, realizado mediante citometría de flujo, sí reveló cambios considerados estadísticamente significativos, a diferencia de los obtenidos en el recuento de leucocitos periféricos totales. Como se observa en la Figura 4.14A, los porcentajes de células T (OX19⁺)

sufrían una disminución detectable el día 8 y que se pronunciaba el día 13, llegando a descender un $48,75 \pm 5,50\%$ con respecto al Grupo Control. La normalización de la celularidad no se apreciaba aún a día 23, aunque los valores comenzaban ya a recuperarse.

Esta pérdida de linfocitos T en sangre era claramente contrarrestada por un aumento del número de linfocitos OX33⁺ (células B), que era máximo el día 13 ($33,74 \pm 8,99\%$) (Figura 4.14B). La complementariedad de ambos sucesos podría explicar las escasas diferencias encontradas al analizar el número total de linfocitos.

Por último, el análisis de las distintas subclases de linfocitos T periféricos demostró que tanto las células W3/25⁺ (linfocitos T cooperadores), como OX8⁺ (linfocitos T citotóxicos/supresores), sufrían variaciones a lo largo de la enfermedad como consecuencia de la administración de Cl₂Hg (Figura 4.14C y D). Así, las células W3/25⁺ mostraban una clara disminución durante el experimento ($25,03 \pm 2,87\%$ vs $42,41 \pm 3,58\%$), siguiendo, además una cinética muy similar a la observada para células T totales. El número total de células CD8⁺ experimentaba el efecto contrario, aumentando a partir del día 13 y constituyendo un incremento del $78,34 \pm 9,56\%$ con respecto al control. El aumento persistía aún el día 23.

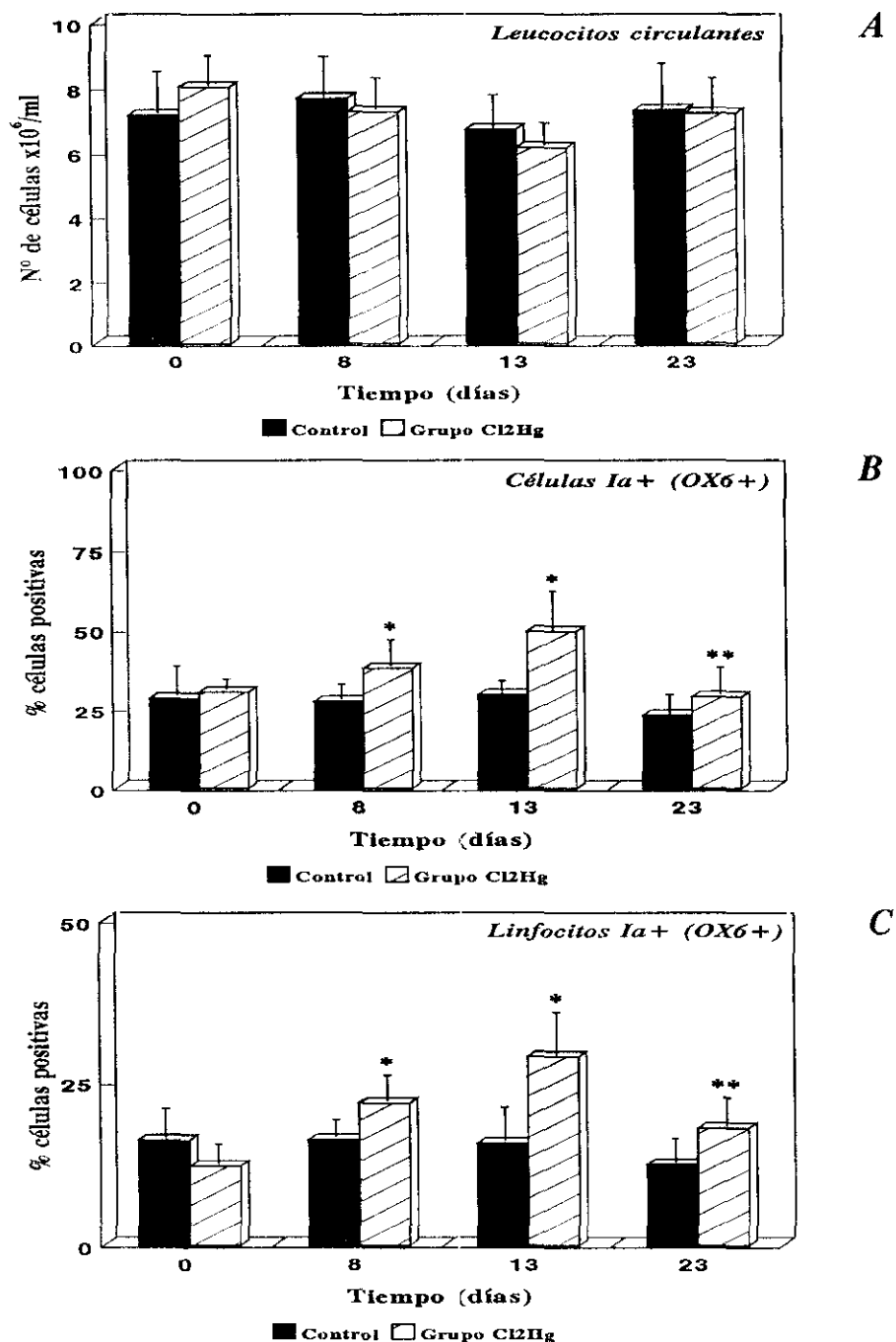


Figura 4.13. Recuento de los leucocitos periféricos y cinética de la expresión de moléculas Ia durante el desarrollo de la nefritis autoinmune en células de sangre periférica. A) La gráfica representa el número total de células blancas a lo largo de la enfermedad. En B y C se representan los valores obtenidos con el marcador OX6 (antígeno Ia) los días críticos de la enfermedad, comparándose los porcentajes de leucocitos totales (B) y de linfocitos (C) Ia⁺ del grupo que desarrolló la enfermedad (Grupo Cl₂Hg), con el Grupo Control (inyectado con H₂O, pH 3.8). Los valores representados corresponden a la media \pm DE obtenida de n=10 y n=20 para el Grupo Control y el Grupo Cl₂Hg, respectivamente. *p<0.01, **p<0.05.

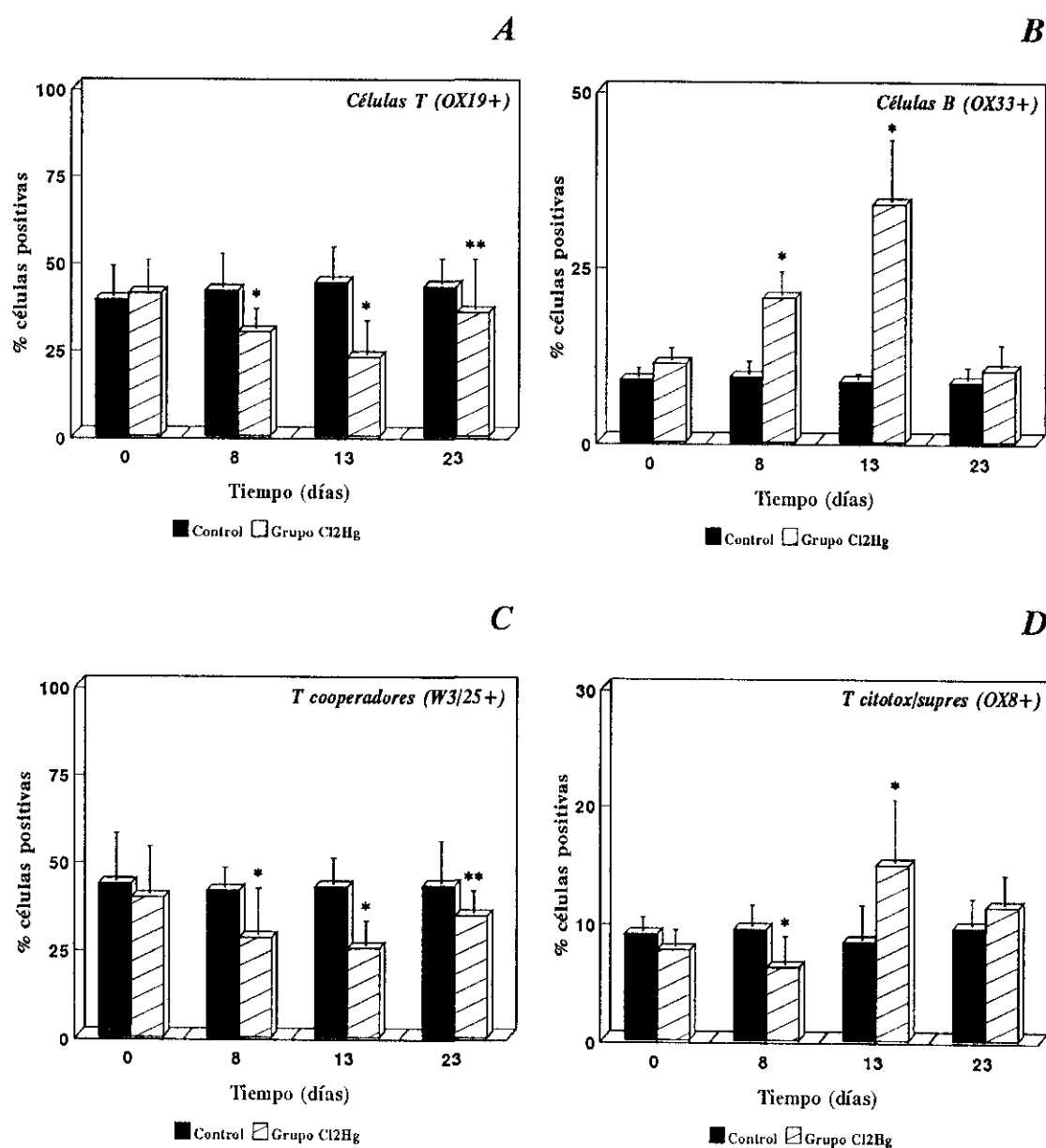


Figura 4.14. Variaciones observadas en las distintas poblaciones de linfocitos periféricos y sus subclases durante el curso de la nefritis autoinmune. A) Porcentaje de células T (OX19⁺). B) Variación en las proporciones de células B en sangre periférica (OX33⁺). C) Porcentaje de células T cooperadoras (W3/25⁺) y D) de células T citotóxicas/supresoras (OX8⁺). Los valores representados corresponden a la media \pm DE de n=10 para el Grupo Control y n=20 para el Grupo Cl₂Hg. *p<0.01, **p<0.05.

4.2. TRATAMIENTO CON Acs DIRIGIDOS CONTRA LA INTEGRINA $\alpha 4$

4.2.1. Determinación del tratamiento

Tras realizar un ensayo previo para determinar el tratamiento con el AcM HP2/1, detallado en el apartado 3.3.2.1.a de Material y Métodos, y ateniéndonos a los resultados obtenidos (Figura 4.15), se dedujo que la administración de 1 mg de HP2/1, dividida en 2 dosis, causaba un escaso efecto sobre la proteinuria, únicamente significativo a partir del día 17 de la enfermedad. Sin embargo, el efecto provocado en la proteinuria en los animales que recibieron 1,5 mg era más drástico. Esta cantidad, administrada en una única dosis, producía una reducción de, aproximadamente, el 50% con respecto a la proteinuria encontrada en los animales sin tratamiento. Por el contrario, al dividir esta misma cantidad en tres dosis, repartidas a lo largo del experimento, la eficacia aumentó considerablemente.

De esta forma se determinó que el tratamiento con HP2/1 se realizaría en tres dosis intraperitoneales de 0,5 mg en los días 0, 8 y 13 de la enfermedad (contando como día 0 el día en que se dio la primera inyección de mercurio).

4.2.2. Efecto de la administración del AcM contra la integrina $\alpha 4$ en ratas Brown Norway tratadas con Cl_2Hg

4.2.2.1. Sobre la proteinuria

Se realizó un exhaustivo seguimiento de los niveles de proteínas en la orina en

aquellos animales que fueron sometidos al tratamiento adicional con el anticuerpo monoclonal HP2/1, como se describe en el apartado 3.3.2.1 de Material y Métodos. El resultado de este estudio queda representado en la Figura 4.16. Como ocurría con el grupo de ratas que sirvieron para realizar el seguimiento de todos los parámetros de esta enfermedad (Grupo Cl₂Hg, Figura 4.1) en este grupo de animales se observaba invariablemente la fase transitoria de proteinuria durante los primeros días de la enfermedad, consecuencia de la acción tóxica directa del mercurio. Por tanto, el tratamiento con HP2/1 no tenía ningún efecto apreciable sobre esta primera fase de excreción de proteínas.

Sin embargo, una vez recuperados los niveles basales tras la primera fase, los animales tratados nunca llegaron a alcanzar rangos de proteinuria nefrótica, siendo los valores máximos alcanzados de $36,80 \pm 0,82$ mg/24 horas. Esta reducción con respecto a las ratas que no sufrieron tratamiento alguno, revela una efectividad de éste sobre la proteinuria del orden de un 80%. Es de destacar que el 100% de los animales que recibieron las inyecciones adicionales de HP2/1 respondieron de idéntica forma al tratamiento.

4.2.2.2. Sobre el infiltrado celular

La especificidad del AcM HP2/1 [Sánchez-Madrid, 1986] (reconoce la integrina $\alpha 4$; tabla 3.1) y su muy conocido papel en la migración y extravasación de leucocitos a focos de inflamación [revisado en Springer, 1994], hacía obvia la búsqueda del efecto de dicho monoclonal sobre el infiltrado celular que aparecía como una constante en

el grupo de ratas tratadas con Cl_2Hg (apartado 4.1.2). De esta forma, se tomaron muestras renales los mismos días que fueron estudiados en las ratas que no recibieran tratamiento adicional y procesados como se especifica en el apartado 3.4.5 de Material y Métodos.

El estudio por microscopía óptica de los cortes de tejido renal permitió comprobar la ausencia, prácticamente total, de infiltrado celular. Las regiones perivasculares estaban totalmente limpias de células hematopoyéticas, como se evidencia en la Figura 4.17A, . Aparecía un número muy pequeño de células infiltrando el intersticio, que coincidía con el número encontrado en las muestras renales del grupo de ratas Brown Norway que no recibieron ningún tipo de tratamiento o que fueron inyectados con H_2O .

4.2.2.3. Sobre los depósitos glomerulares de Ig

La observación con microscopio de fluorescencia de cortes de tejido renal procesados por inmunofluorescencia directa (apartado 3.6.2.2) nos demostró la ausencia de cualquier tipo de depósito glomerular (Figura 4.17B), tanto de IgG como IgM.

4.2.2.4. Sobre la síntesis de autoanticuerpos

4.2.2.4.a. Síntesis de anticuerpos contra la MBG. Teniendo en cuenta el efecto conseguido por la administración del AcM HP2/1 sobre la proteinuria, y sobre todo, dada la ausencia total de depósitos glomerulares de Ig de rata contra antígenos de la

membrana basal glomerular, fue conveniente la búsqueda de Acs circulantes contra la MBG en el grupo que recibieran el tratamiento adicional de este monoclonal. Para ello las muestras de suero tomadas y procesadas como se detalla en el apartado 3.4.2, fueron analizadas por medio de un método inmunoenzimático (apartado 3.5.2.1).

Como puede apreciarse en la Figura 4.18A, la producción de autoanticuerpos contra la MBG experimentaba una gran disminución en sus niveles en sangre, llegando a alcanzar dicho descenso una proporción de casi el 70% ($46,45 \pm 2,39\%$ vs $138,75 \pm 20,50\%$). Por otra parte, la comparación del nivel de autoanticuerpos entre el grupo de ratas tratadas con HP2/1 y el Grupo Control, aún mostraba un incremento del primero de un 25%, siendo aún esta diferencia significativa ($p < 0.001$).

4.2.2.4.b. Síntesis de anticuerpos contra el ADN. El estudio de un anticuerpo que no tiene efectos patológicos en los animales nos permitió demostrar si el efecto provocado por HP2/1 podía ser causado sobre la síntesis de cualquier tipo de autoanticuerpo.

El mismo análisis realizado para el seguimiento de la cinética de la producción de Acs contra MBG se realizó para el de ADN (apartado 3.5.2.2). La figura 4.18B muestra el resultado de tal estudio. Como puede apreciarse no existen diferencias significativas en los niveles de anticuerpos contra el ADN monocatenario en el grupo que recibió el tratamiento adicional con HP2/1, con respecto a los animales a los que únicamente se les indujo la enfermedad con mercurio.

4.2.2.5. Sobre la población leucocitaria de sangre periférica

El estudio realizado en sangre periférica, llevado en paralelo con el Grupo Cl₂Hg, mostraba algunas diferencias importantes con respecto al Grupo Control. El estudio del número total de leucocitos en sangre no proporcionó ninguna diferencia significativa con respecto al control (Figura 4.19A).

Por el contrario, el análisis por citometría de flujo de la población leucocitaria sí mostraba algunas diferencias. La proporción de células portadoras de la molécula la experimentaba un aumento, al compararlas con el Control, de un $98,50 \pm 19,37\%$, correspondiente al día de máxima expresión (día 13) (Figura 4.19B). Según muestra la Figura 4.19C, del aumento de células portadoras del antígeno Ia, un 60%, aproximadamente, correspondía a la población linfocitaria.

La población de células T, sin embargo, mostraba una disminución en sus porcentajes que comenzaba a ser significativa a día 8 ($32,67 \pm 7,59\%$ vs $41,62 \pm 5,26\%$, $p < 0.01$), pero que era máxima el día 13 ($25,98 \pm 7,32$ vs $43,92 \pm 5,38$) (Figura 4.20A). La recuperación de los niveles normales comenzaba a alcanzarse ya el día 23. Por el contrario, la población B (OX33⁺) mostraba un aumento espectacular desde la primera semana de tratamiento ($33,74 \pm 9,40$ vs $9,16 \pm 1,39$) y disminuía paulatinamente, pero conservando aún un incremento significativo ($p < 0.01$), incluso la tercera semana de enfermedad.

La misma cinética que veíamos para las células B, la pudimos observar al hacer

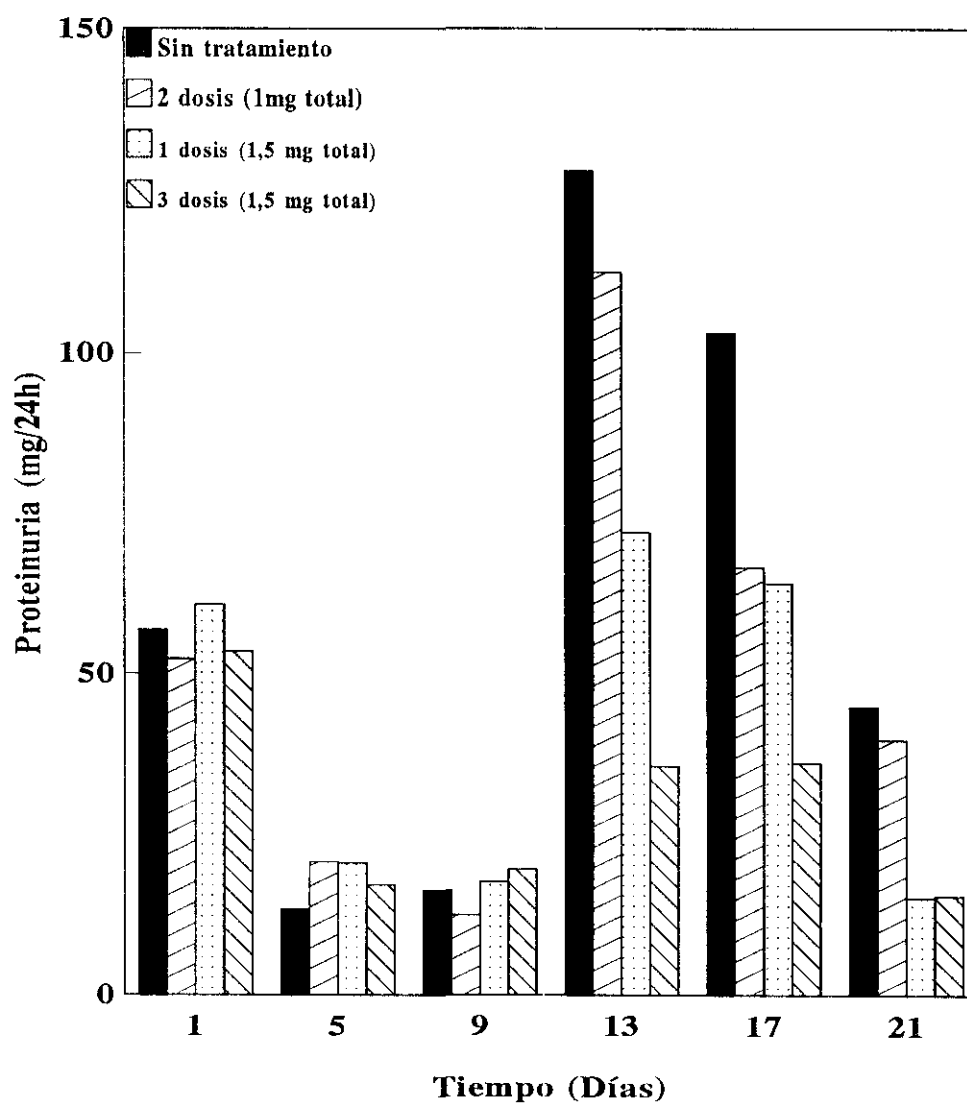


Figura 4.15. Ensayo sobre la administración de las diferentes dosis de HP2/1. Efecto sobre la proteinuria. Un grupo de animales (n=4 por tratamiento) a los que se les indujo la enfermedad, según se especifica en el apartado 3.3.1 de Material y Métodos, fueron sometidos a distintas dosis de HP2/1 (apartado 3.3.2.1.a) y se valoró su efecto midiendo la cantidad de proteínas excretadas en orina siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.5.1.2.

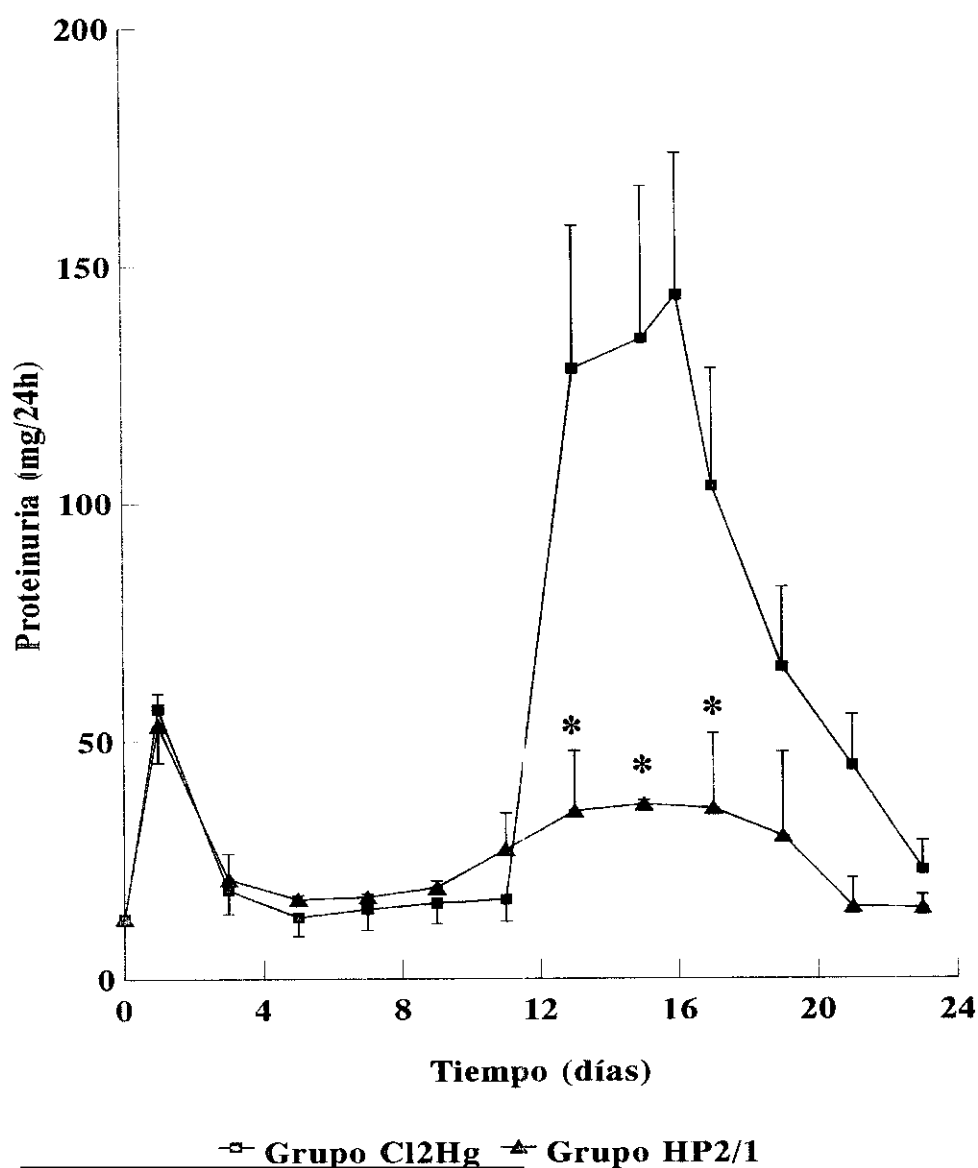
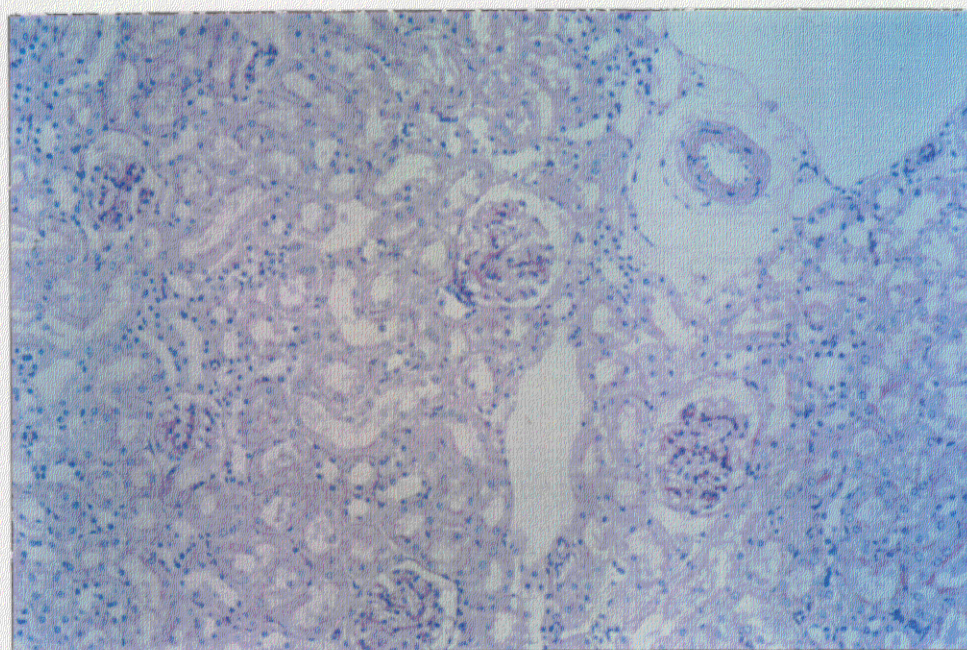
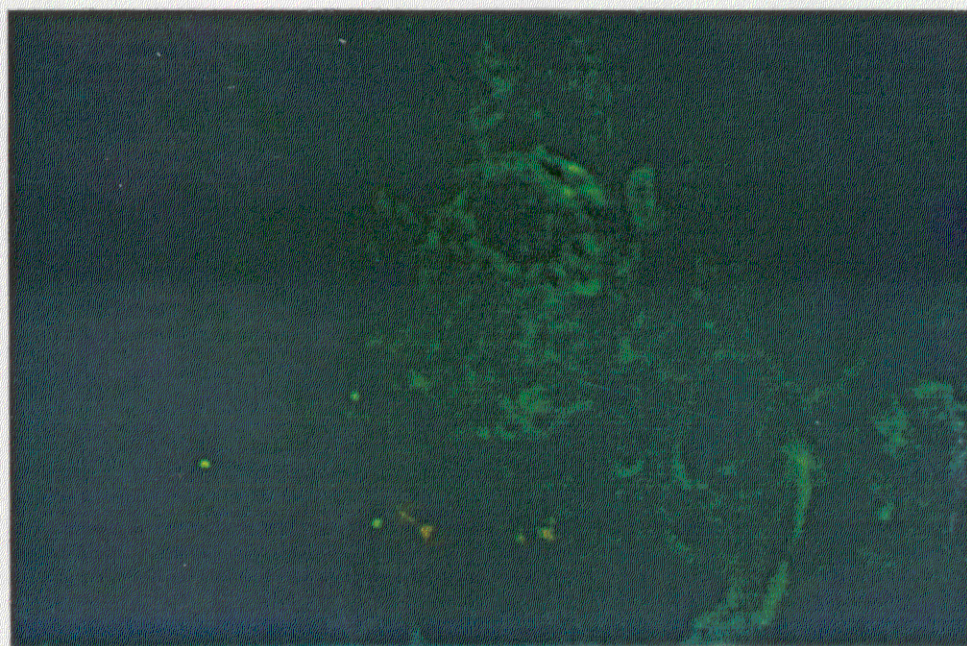


Figura 4.16. Efecto del tratamiento con HP2/1 sobre la proteinuria. Los animales sometidos al tratamiento con HP2/1 muestran una considerable reducción de los niveles de proteína en orina cuando eran comparados con el Grupo Cl₂Hg. Los valores representados son los obtenidos de la media \pm DE de n=20 ratas (Grupo HP2/1) y n=25 (Grupo Cl₂Hg). *p<0.003.



A



B

Figura 4.17. Efecto del tratamiento con HP2/1 sobre la histología renal. A) muestra la ausencia total de células hematopoyéticas infiltrando el riñón, apareciendo tanto las regiones perivasculares, como intersticiales limpias de tales células (PAS x 100). B) muestra, igualmente, la ausencia de depósitos glomerulares de Ig total en los glomerulos (IF x 400).

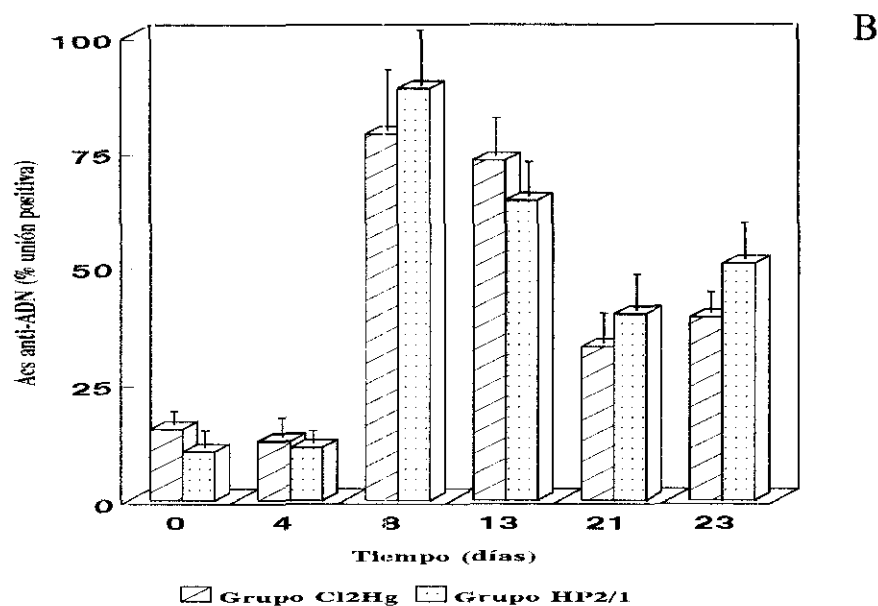
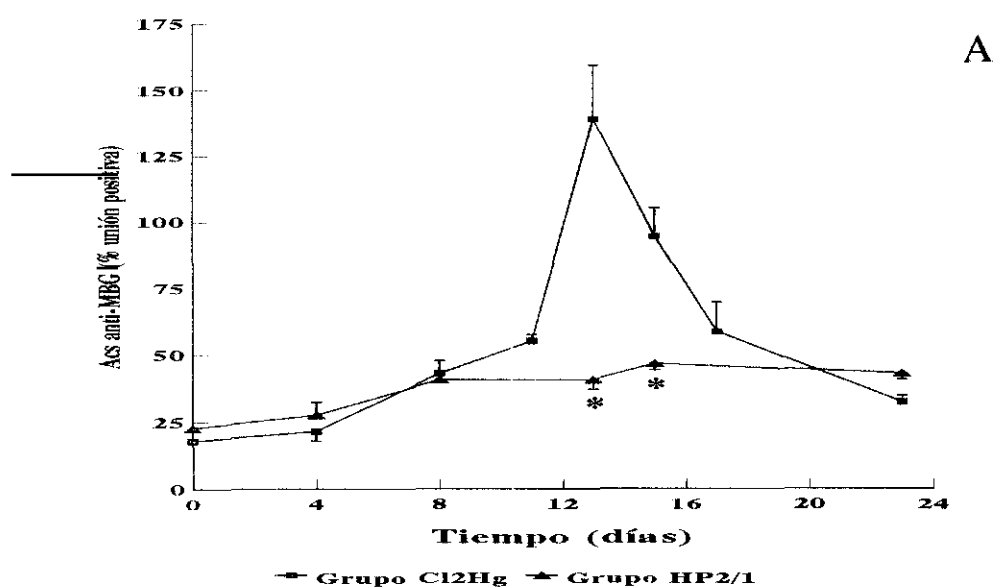


Figura 4.18. Efecto del tratamiento con HP2/1 sobre los niveles séricos de autoanticuerpos. A) Cinética seguida por la secreción de Acs anti-MBG comparada con la del Grupo Cl₂Hg, mostrando una reducción significativa en sus niveles. * $p < 0.002$. B) Porcentaje de unión positiva de Acs anti-ADN del Grupo HP2/1 comparado con el Grupo Cl₂Hg. Los valores representan la media \pm DE de $n=20$ (Grupo HP2/1) y $n=25$ (Grupo Cl₂Hg).

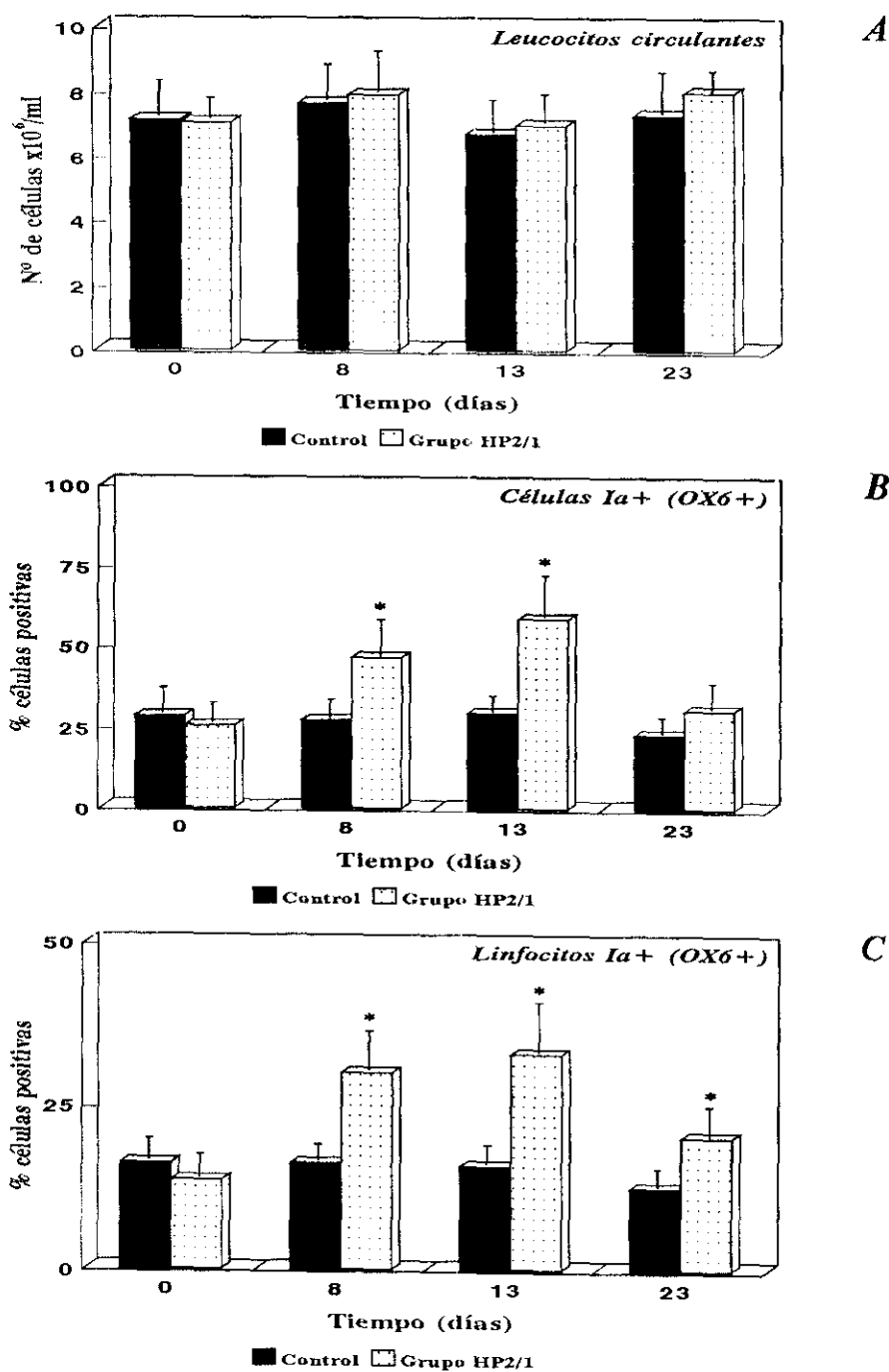


Figura 4.19. Recuento leucocitario y expresión de moléculas Ia (OX6⁺) en sangre periférica de ratas tratadas con HP2/1 durante el transcurso de la enfermedad. Se comparan dichos valores con los obtenidos para el control normal. Se representa el número total de células blancas periféricas (A) y las diferencias existentes entre los resultados obtenidos en el número de células circulantes totales (B) y de la población linfocítica total (C). Los valores representados corresponden a la media \pm DE obtenida de $n=10$ y $n=20$ para el Grupo Control y el Grupo HP2/1, respectivamente. * $p<0.01$.

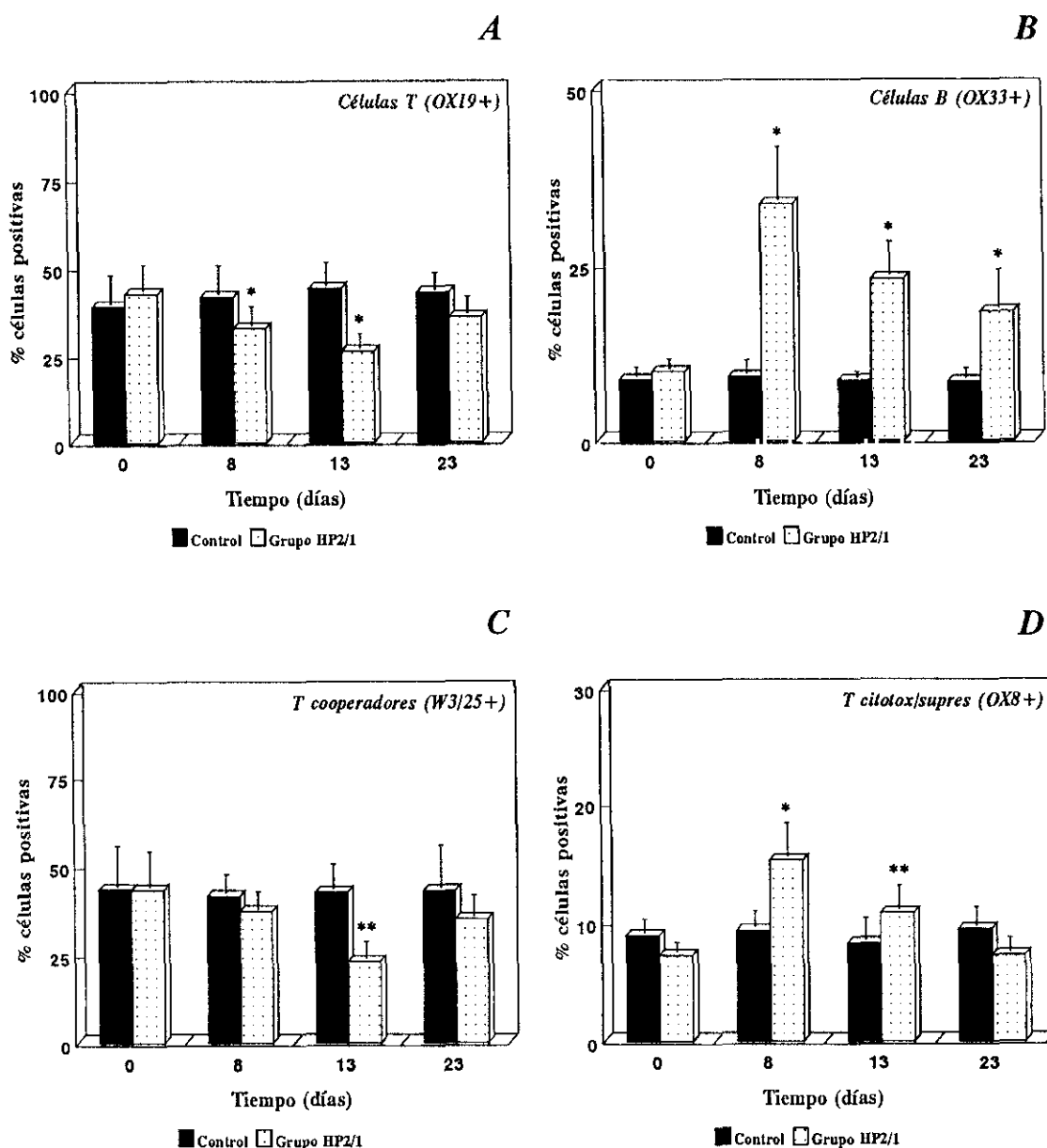


Figura 4.20. Variaciones en las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos circulantes en ratas tratadas con HP2/1. Se compara A) el porcentaje de células T periféricas (OX19⁺), B) células B circulantes (OX33⁺), C) linfocitos T cooperadores (W3/25⁺) y D) linfocitos T citotóxicos/supresores (OX8⁺), con el Grupo Control. Los valores representados corresponden a la media \pm DE obtenida de n=10 para el Grupo Control y n=20 para el Grupo que recibió el tratamiento con HP2/1. *p<0.01, **p<0.02.

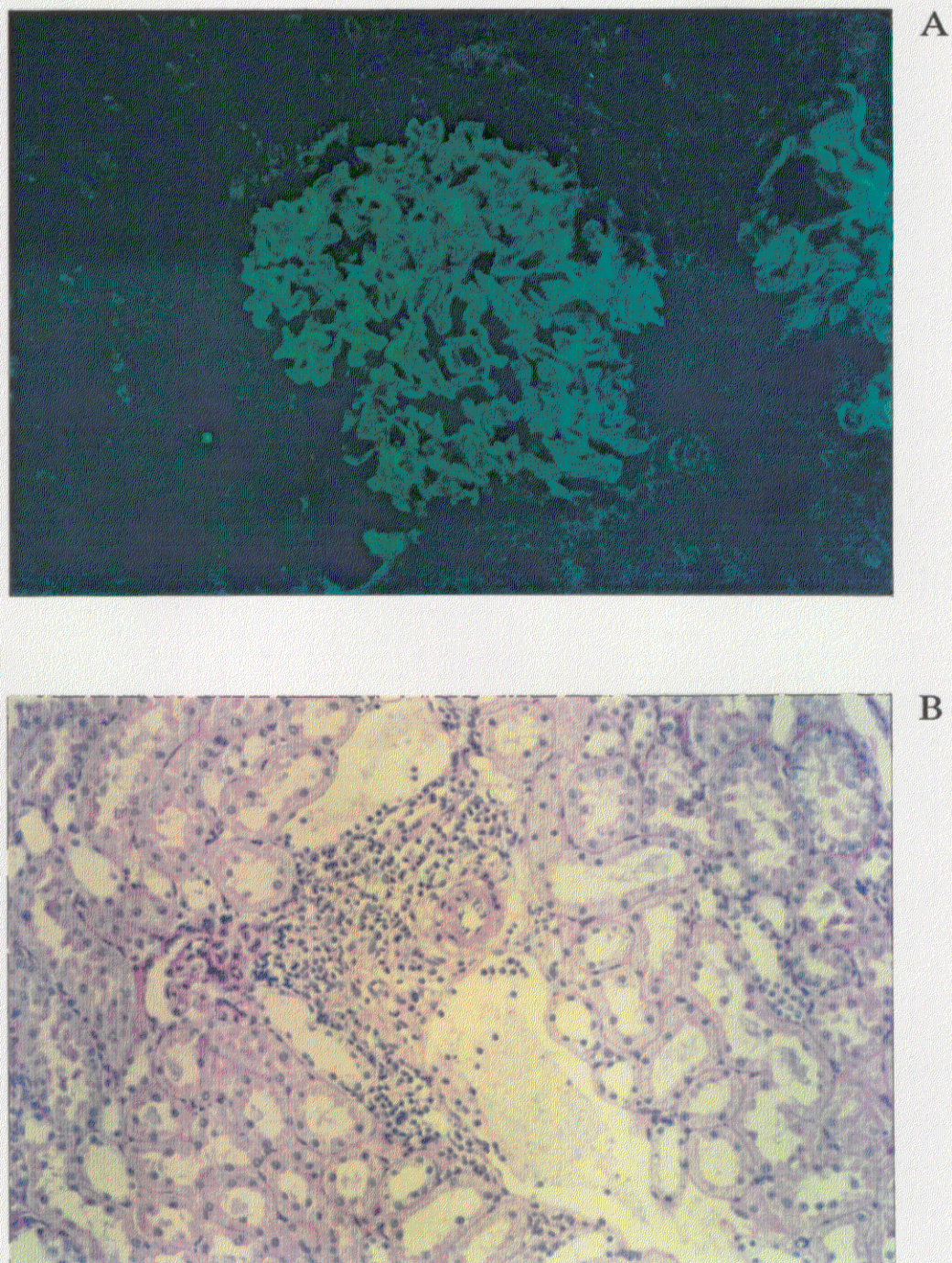


Figura 4.21. Efecto de la transferencia pasiva de antisuero anti-MBG sobre el riñón. La administración i.v. de antisuero anti-MBG a ratas normales evidenció depósitos glomerulares de Ig (A) 23 días después de la inyección (IF x 400), y la aparición de infiltrado (B), también a día 23, con una intensidad menor que la observada para el Grupo Cl₂Hg, pero a pesar de ello muy pronunciado (PAS x 150).

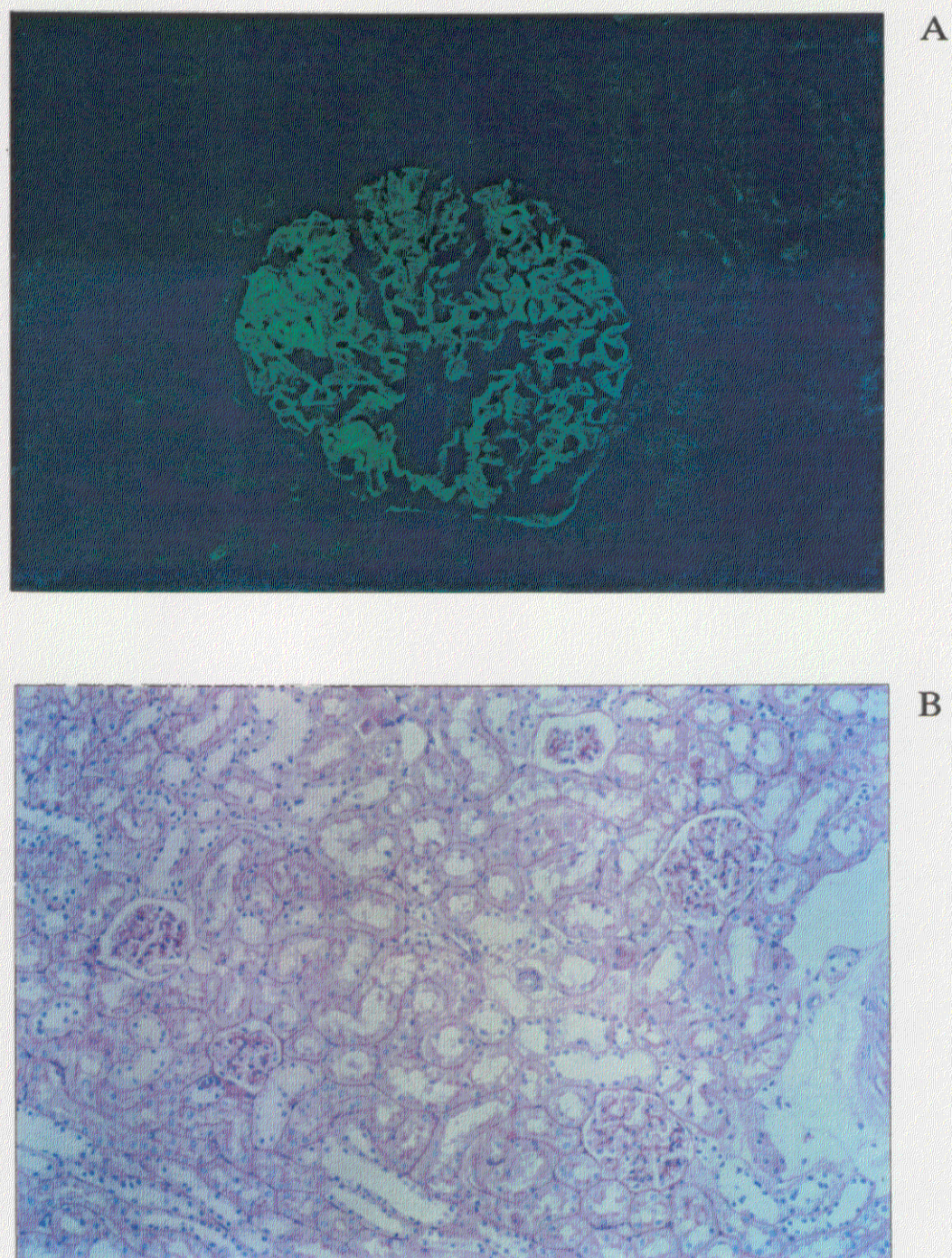


Figura 4.22. Efecto de la administración pasiva de antisuero anti-MBG a ratas tratadas con HP2/1. La administración de antisuero anti-MBG a ratas del Grupo HP2/1 mostraba un patrón de fluorescencia similar al de los animales del Grupo Control de transferencia, ya que los depósitos de Ig se detectaban la tercera semana después de la inyección del antisuero (A) (IF x 400). Sin embargo, no se detectó la presencia de células infiltrantes en ninguno de los cortes renales analizados (B) (PAS x 100).

4.3. EFECTO DE LA ADMINISTRACION DEL Ac CONTRA TNF α A RATAS TRATADAS CON Cl₂Hg

4.3.1. Sobre la proteinuria

Los animales que se sometieron al tratamiento adicional con el Ac contra la citoquina TNF α (apartado 3.3.2.2) no experimentaron incremento de los niveles de proteinuria ($20,20 \pm 7,99$ mg/24 h vs $15,37 \pm 3,25$ mg/24 h) (Figura 4.23). Es destacable que sólo uno de los animales que fueron sometidos al tratamiento experimentó un leve aumento de los niveles de la proteinuria que, sin embargo, no fue superior al 25% con respecto a los niveles basales. Este incremento se evidenció el día 13 de la enfermedad, encontrándose el resto de los días ensayados valores de proteinuria basales. Como se puede apreciar en la Figura 4.23, el aumento transitorio de proteínas en orina, provocado por el efecto tóxico directo del mercurio sobre las células tubulares, es igualmente, invariable después del tratamiento con Acs contra TNF α .

4.3.2. Sobre el infiltrado celular

El estudio mediante microscopía óptica del Grupo de ratas tratadas con anti-TNF α no presentó prácticamente ninguna variación con respecto al Grupo Control. De esta forma, el día 13 de enfermedad (Figura 4.24A) podía apreciarse una ausencia de infiltrado intersticial. Cuando se analizó el infiltrado glomerular con un anticuerpo contra el antígeno leucocitario común (OX1), y se realizó el recuento de células inflamatorias, éste no variaba significativamente con respecto al Grupo Control,

encontrando a la segunda semana de la enfermedad $0,9 \pm 0,1$ células/glomérulo, que contrastaba claramente con el número obtenido el mismo día para el Grupo Cl_2Hg ($1,5 \pm 0,5$ células/glomérulo).

4.3.3. Sobre los depósitos glomerulares de Ig

El estudio histológico de las biopsias renales demostró la existencia de depósitos glomerulares en estos animales (Figura 4.24B), con un patrón, intensidad y cinética comparables a los apreciados en las ratas tratadas únicamente con Hg. El día 13 de enfermedad, cuando se valoró el depósito de Ig total, se observó una patrón lineal. Al realizar el estudio diferencial se pudo comprobar que, tanto el patrón de IgG como de IgM, era lineal. Lo mismo ocurría en el resto de los grupos de ratas que presentaban depósitos glomerulares de Ig. El día 23 de enfermedad el patrón era mixto (lineal y granular) para IgG, siendo lineal para la IgM.

4.3.4. Sobre la síntesis de autoanticuerpos

Las muestras de suero obtenidas días alternativos a lo largo de la enfermedad fueron ensayadas para valorar los niveles de anticuerpos contra la MBG, así como de Acs contra el ADN, determinándose que éstos eran equivalentes a los existentes en el grupo tratado con Cl_2Hg ($127,4 \pm 49,73\%$ vs $138,75 \pm 20,50\%$ en el caso de Acs anti-MBG y $85,17 \pm 11,47\%$ vs $73,05 \pm 9,20\%$ para Acs anti-ADN). En la Figura 4.25 puede apreciarse cómo la cinética de producción de estos anticuerpos no muestran diferencias significativas entre ambos grupos, concluyéndose que el tratamiento con anti-TNF α no ejercía ningún efecto sobre la síntesis de anticuerpos.

4.3.5. Sobre la población leucocitaria de sangre periférica

Mientras que el recuento leucocitario de sangre periférica no mostraba ninguna variación significativa con respecto al Grupo Control (Figura 4.26A), al analizar el porcentaje de marcaje positivo para el AcM OX6 (antígeno Ia) se detectó un aumento significativo sólo a partir del día 13 de enfermedad, tanto al estudiar la población leucocitaria total, que llegaba a aumentar un 50% (Figura 4.26B), como al analizar los linfocitos totales de sangre, cuyo aumento era similar al anterior (Figura 4.26C). No menos de un 50% de células OX6⁺ totales pertenecían a la población linfocitaria.

El análisis por citometría de flujo de la población de linfocitos T (OX19⁺) (Figura 4.27A) demostró que el tratamiento con anticuerpos dirigidos contra la citoquina TNF α causaba un efecto sobre dicha población que comenzaba a evidenciarse el día 8, en el que ya se detectaba una reducción significativa ($p < 0.05$) de la proporción de células T circulantes. Este descenso continuaba a lo largo del experimento sin llegar a recuperar los niveles basales, si bien a día 23 se llegaba a alcanzar la proporción más baja de esta población ($25,52 \pm 5,31\%$ vs $42,81 \pm 3,96\%$). Por el contrario, los linfocitos B (OX33⁺) (Figura 4.27B) comenzaban un progresivo incremento desde el día 8 y culminando el día 13 ($24,58 \pm 4,51\%$ vs $8,54 \pm 0,86\%$). Las subclases de linfocitos T seguían diferente cinética. Así, la subpoblación de células T cooperadoras, lo mismo que ha quedado demostrado para el resto de grupos de tratamiento, seguían una cinética similar a la de linfocitos T totales. De esta forma, las células W3/25⁺ (Figura 4.27C) comenzaban a descender desde el día 8 y aún a día 23 mostraban una importante reducción, sin recuperar sus niveles normales ($26,52 \pm$

7,12% vs $42,80 \pm 5,59\%$). Los porcentajes de células T citotóxicas/supresoras (OX8⁺) (Figura 4.27D) aumentaban significativamente desde el día 8 de enfermedad ($p < 0.01$) y se mantenía altos hasta la segunda semana, para recuperar sus niveles a día 23.

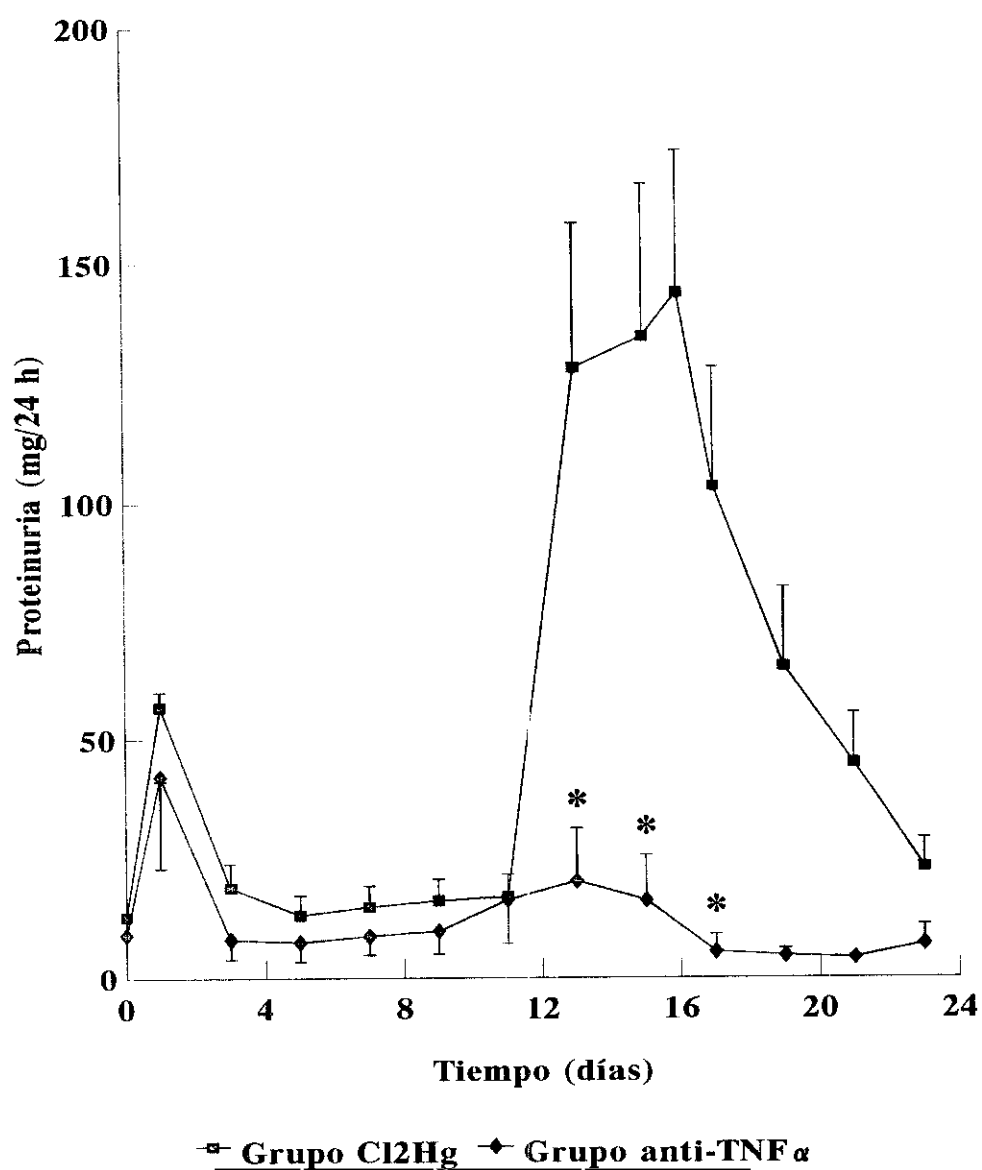
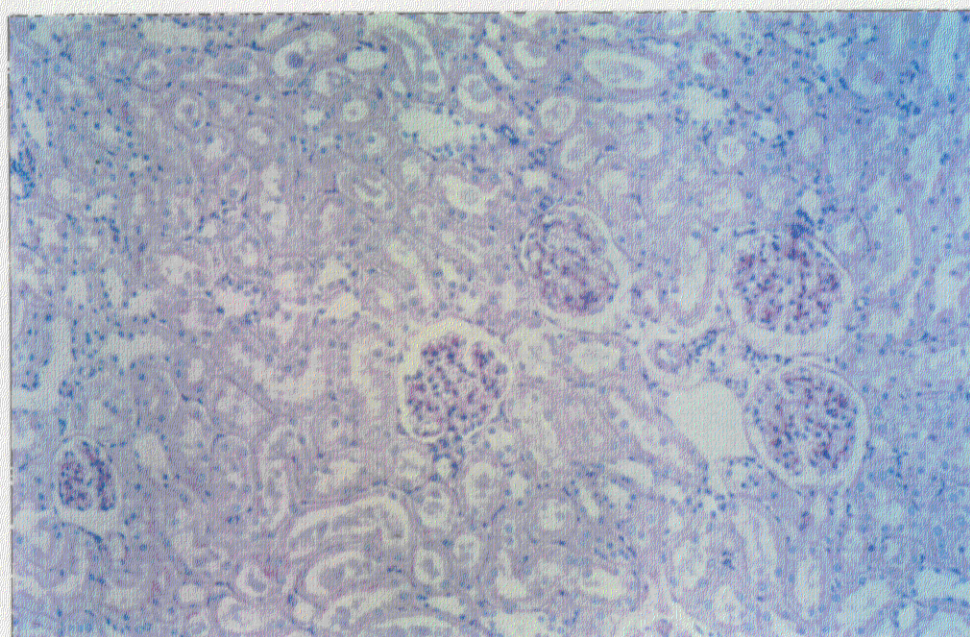
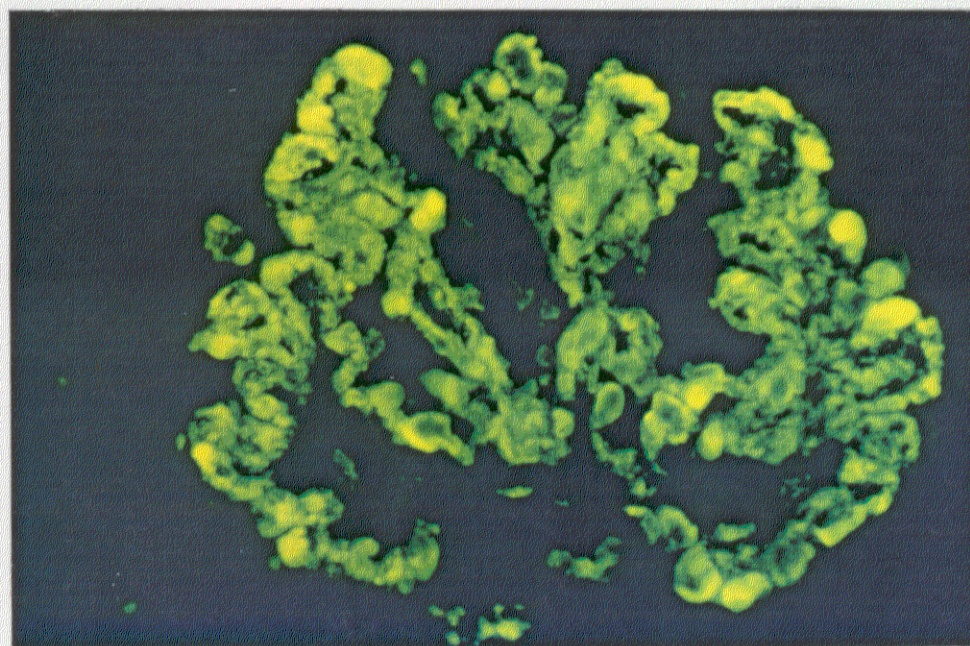


Figura 4.23. Efecto sobre la excreción de proteínas causado por la administración de Acs anti-TNF α . Se puede observar cómo, comparado con el Grupo Cl₂Hg, se ha producido una considerable reducción de dichos niveles. Los valores representados corresponden a la media \pm DE de n=20 ratas para el Grupo anti-TNF α y n=25 para el Grupo Cl₂Hg. *p<0.003.



A



B

Figura 4.24. Efecto del tratamiento con Acs anti-TNF α sobre el infiltrado y depósitos glomerulares de Ig. A) muestra la ausencia prácticamente total de células inflamatorias invadiendo el riñón (PAS x 100). B) Por el contrario se veía claramente la existencia de depósitos glomerulares como se evidenciaba al realizar un marcaje con un Ac anti-Ig total de rata (IF x 600).

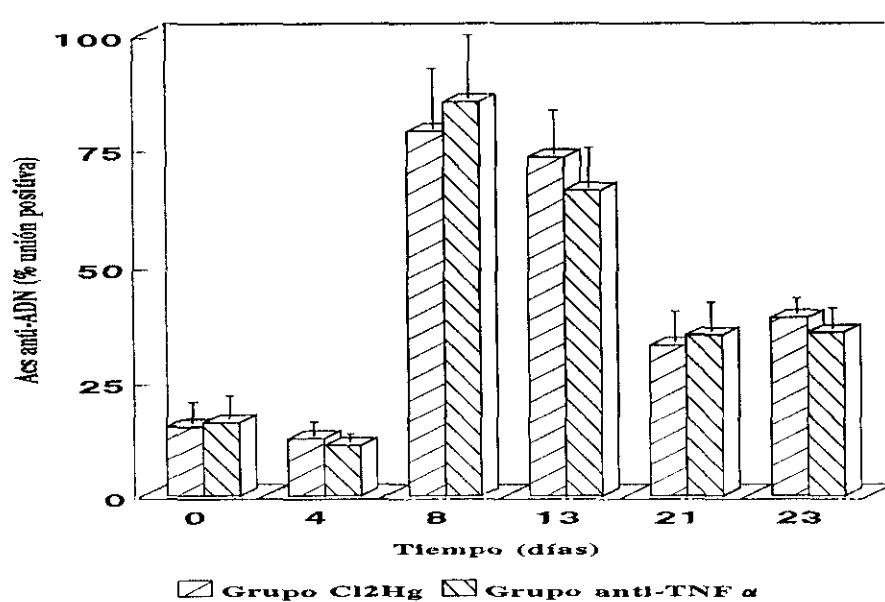
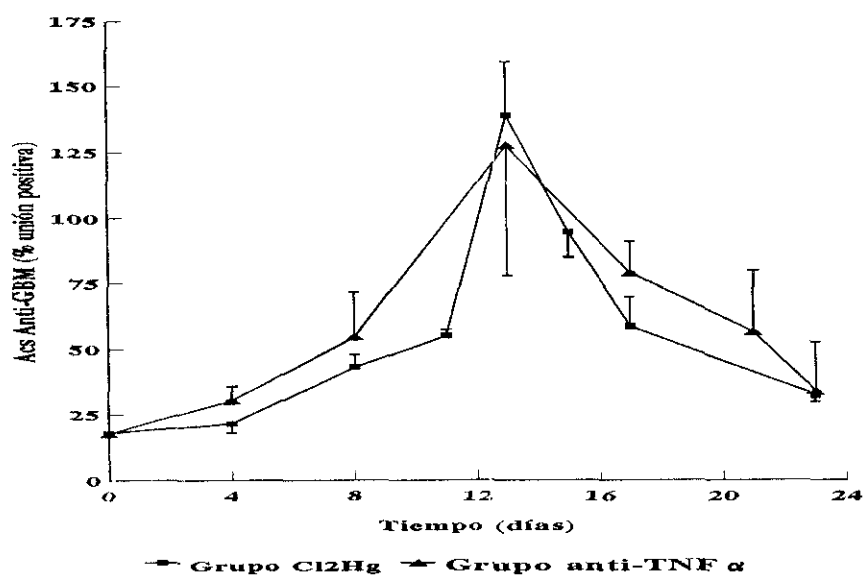


Figura 4.25. Efecto del tratamiento con Acs anti-TNF α sobre la producción de autoanticuerpos. Al comparar las cinéticas de producción de anticuerpos de este grupo experimental con la obtenida para el Grupo Cl_2Hg no se observaron diferencias significativas ni en los niveles séricos de anti-MBG (A) ni en los niveles de anticuerpos anti-ADN (B). Los valores representados corresponden a la media \pm DE de $n=20$ para el Grupo anti-TNF α y $n=25$ para el Grupo Cl_2Hg .

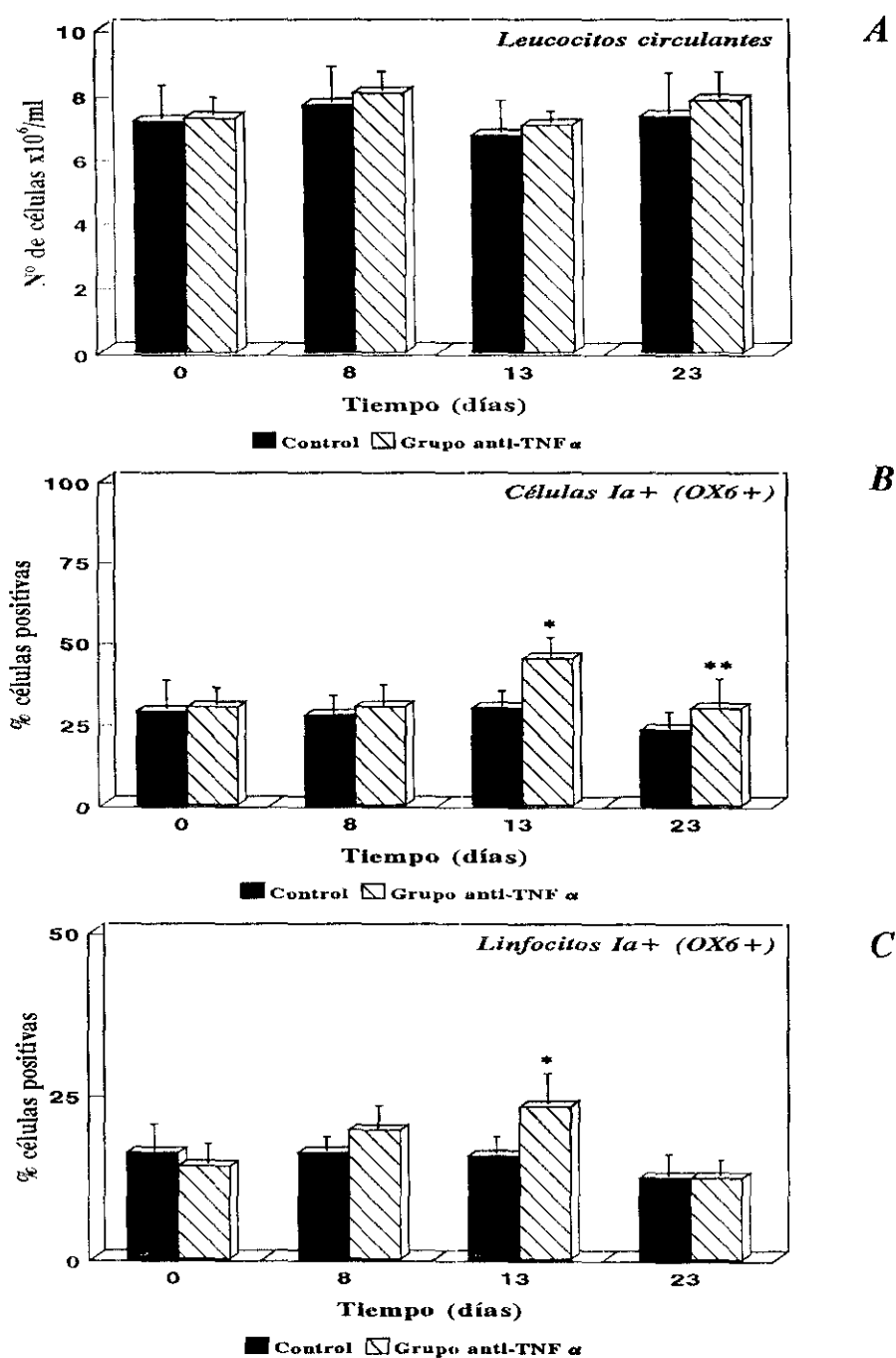


Figura 4.26. Número total de células blancas circulantes y expresión de moléculas Ia (OX6⁺) en ratas tratadas con Acs anti-TNFα durante el transcurso de la enfermedad. Se representan los valores obtenidos por el Grupo anti-TNFα frente al Grupo Control observándose el número total de leucocitos (A), el porcentaje de células marcadas con OX6 totales (B) y de la población linfocítica total OX6⁺ (C). Los valores representados corresponden a la media \pm DE obtenida de n=10 y n=20 para el Grupo Control y el Grupo anti-TNFα, respectivamente. *p<0.01, **p<0.05.

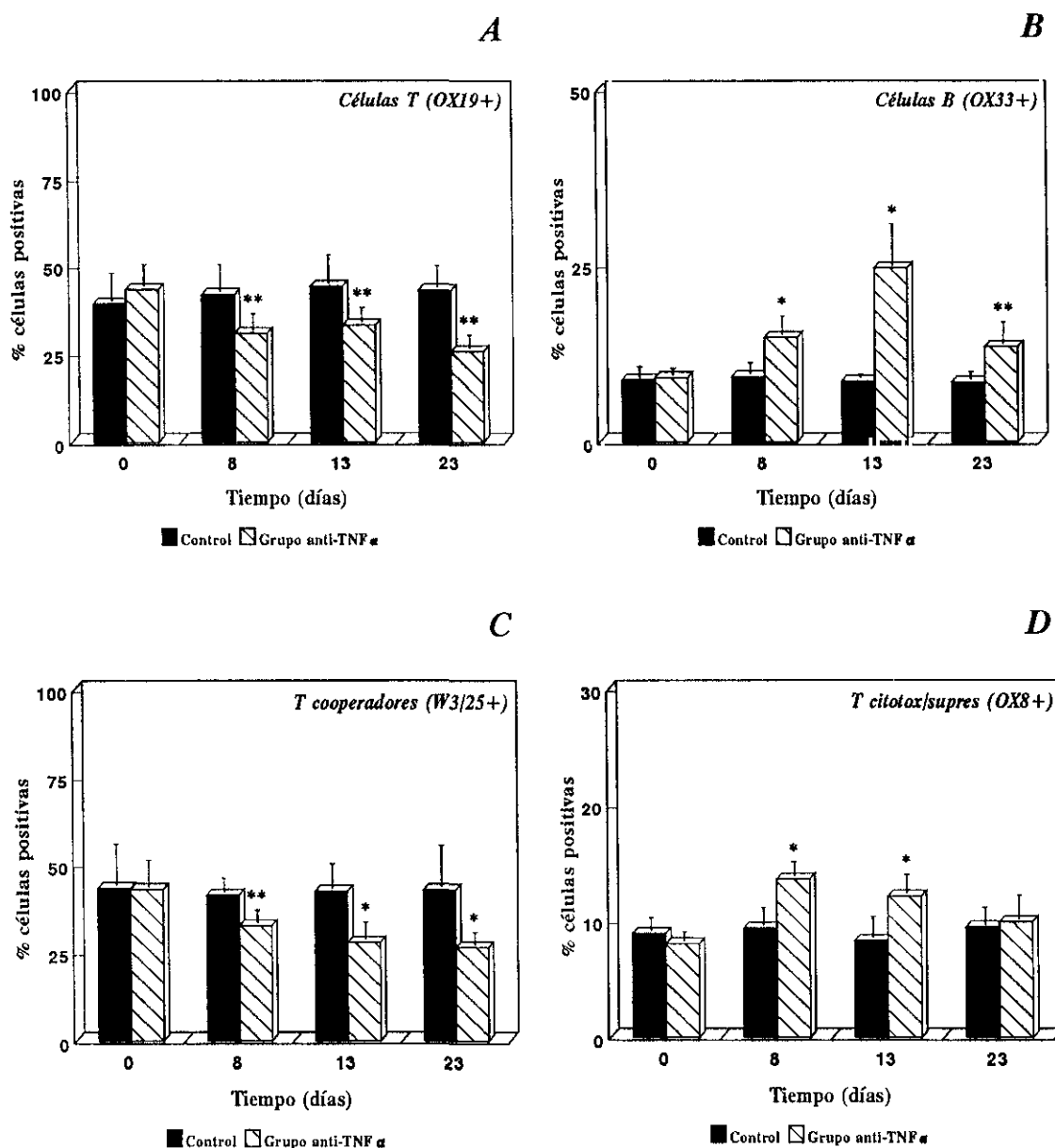


Figura 4.27. Variaciones en las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos circulantes en ratas tratadas con Acs anti-TNF α . Se compara A) el porcentaje de células T periféricas (OX19⁺), B) células B circulantes (OX33⁺), C) linfocitos T cooperadores (W3/25⁺) y D) linfocitos T citotóxicos/supresores (OX8⁺), con el Grupo Control. Los valores representados corresponden a la media \pm DE obtenida de n=10 ratas para el Grupo Control y n=20 para el grupo que recibió el tratamiento con HP2/1. *p<0.01 y **p<0.05.

4.4. COMPARACION DE LA CINETICA DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS DE LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO CON EL GRUPO Cl₂Hg

4.4.1. Número total de leucocitos

La comparación de los Grupos HP2/1 y anti-TNF α con el Grupo Cl₂Hg no mostraba ninguna diferencia significativa cuando se estudió el recuento de células blancas de sangre periférica (Figura 4.28A), no existiendo tampoco diferencias significativas de ninguno de los grupos con el Control.

4.4.2. Expresión de moléculas Ia

En sangre periférica las cinéticas, tanto de células totales portadoras del antígeno Ia como de linfocitos totales, revelaban siempre que el Grupo HP2/1 mostraba mayor expresión de éste, si bien no llegaba a ser significativa con respecto al Grupo Cl₂Hg excepto para el día 8 en linfocitos Ia⁺. Por el contrario, el Grupo anti-TNF α aparecía siempre por debajo del Grupo Cl₂Hg, siendo significativa la diferencia únicamente el día 13 cuando se refería a linfocitos totales marcados con OX6 (Figura 4.28A y B). A la vista de la representación gráfica de los porcentajes de expresión de MHC clase II (Ia), el tratamiento con HP2/1 parece aumentar ligeramente el número de células activadas, frente a la menor activación del Grupo anti-TNF α .

4.4.3. Población linfocitaria y subclases

Las diferencias más significativas en este análisis nos la proporcionó el estudio de los marcadores de células B (OX33) y de linfocitos T citotóxicos/supresores (OX8)

(Figura 4.29B y D, respectivamente). En cuanto a la población B, el Grupo HP2/1 mostraba una cinética totalmente diferente con respecto al Grupo Cl₂Hg, ya que, a diferencia de éste, aparecía el mayor porcentaje de células B la primera semana de tratamiento y no la segunda, como ocurría con los demás grupos. El Grupo anti-TNF α , a pesar de tener una cinética similar al grupo de comparación (Grupo Cl₂Hg), presentaba unos niveles inferiores de células B, aunque no siempre eran significativos. La subclase de linfocitos T citotóxicos/supresores tenían una cinética similar para los Grupos que recibieran tratamiento con Acs. Mientras que el Grupo Cl₂Hg mostraba una disminución de los porcentajes de células OX8⁺ el día 8, los dos grupos de tratamiento experimentaban un aumento significativo ($P < 0.01$).

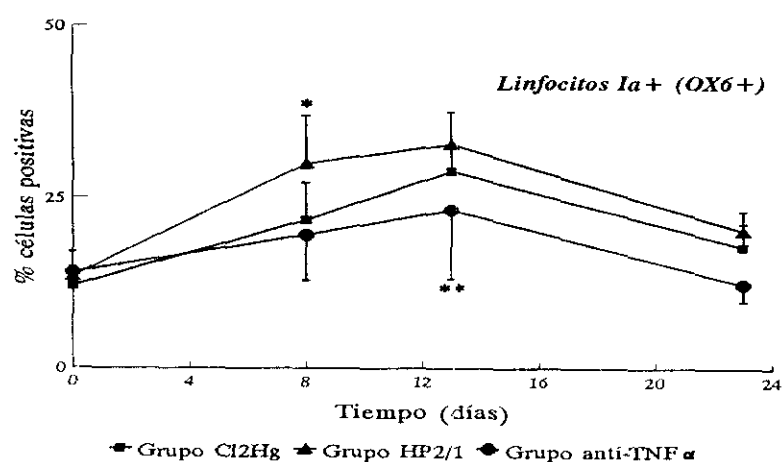
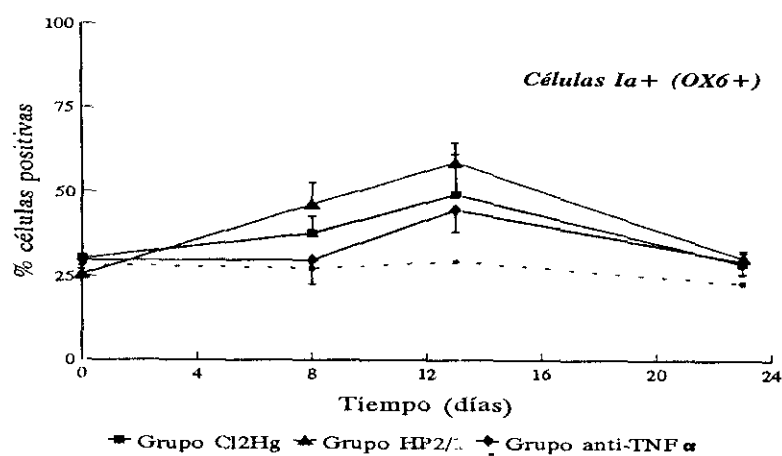
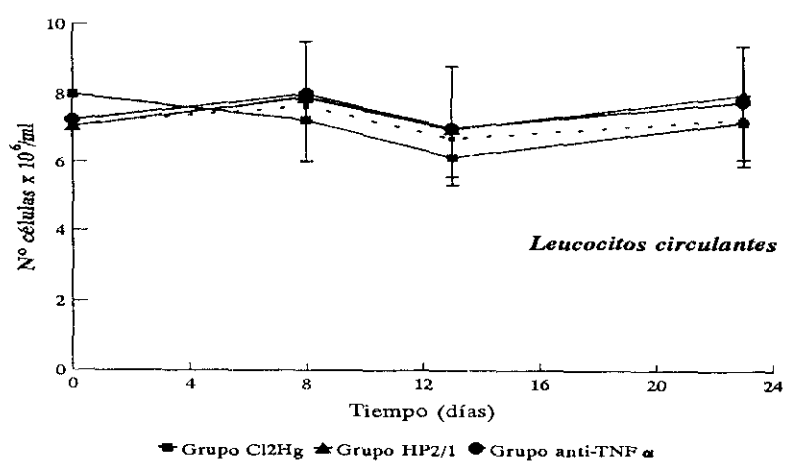


Figura 4.28. Comparación del número total de leucocitos y de los porcentajes de células OX6⁺ en sangre periférica de los grupos de tratamiento con el Grupo Cl₂Hg. Se muestran los resultados de los tres grupos, Cl₂Hg, HP2/1 y anti-TNF α , junto con el Grupo Control (línea punteada) para el recuento de células blancas periféricas (A) y los porcentajes de células totales y linfocitos Ia⁺ (B y C, respectivamente). Los valores representan la media \pm DE de n=20 ratas por grupo y día. Las probabilidades que se indican en las gráficas corresponden a las obtenidas al comparar el Grupo Cl₂Hg con el grupo de tratamiento correspondiente. *p<0.01, **p<0.05.

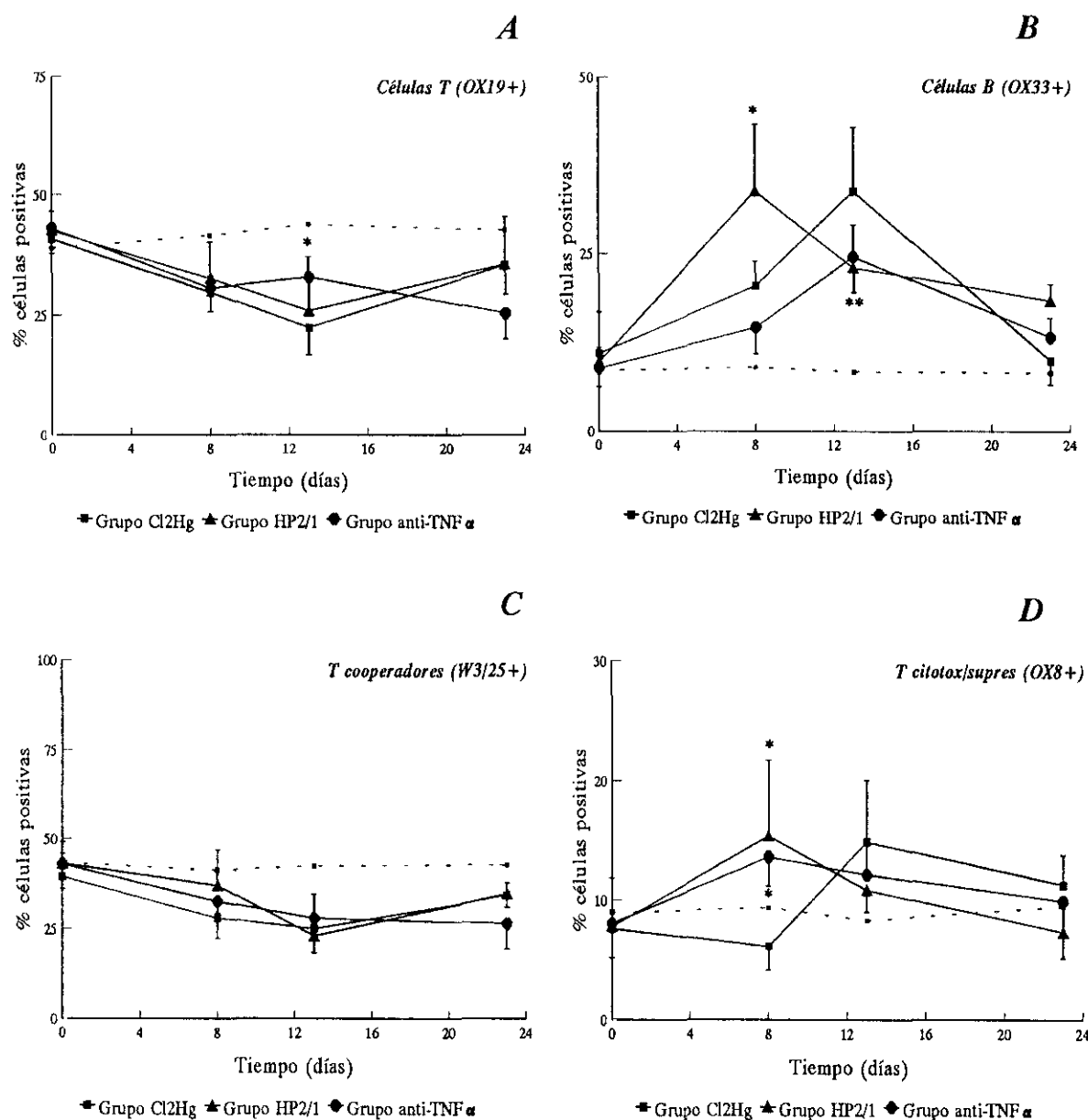


Figura 4.29. Comparación de las poblaciones de linfocitos periféricos y subclases de los distintos tratamientos con el Grupo Cl₂Hg. Los porcentajes de células T (OX19⁺) (A), células B (OX33⁺) (B), células T cooperadoras (W3/25⁺) (C) y células T citotóxicas/supresoras (OX8⁺) (D) circulantes del grupo que desarrolló la enfermedad (Grupo Cl₂Hg) es comparado con los grupos que fueron sometidos al tratamiento con Acs HP2/1 o anti-TNF α . La línea punteada representa el Grupo Control. Los valores representados se han obtenido de la media \pm DE n=20 ratas por grupo y día. Las probabilidades representadas son las resultantes de la comparación de los grupos de tratamiento con el Grupo Cl₂Hg. *p<0.01, **p<0.05.

4.5. RESULTADO DE LA ADMINISTRACION DE Acs CONTRA EL ANTIGENO LEUCOCITARIO COMUN (CD45)

Con el fin de determinar la especificidad de los efectos conseguidos en la administración de los diferentes anticuerpos utilizados en el tratamiento de la nefritis autoinmune inducida por Cl_2Hg , se estudiaron los efectos que sobre esta enfermedad podría provocar la administración de un anticuerpo irrelevante. Se eligió por ello un anticuerpo dirigido contra el antígeno leucocitario común (apartado 3.3.2.3).

Se analizaron los parámetros más destacados de la enfermedad, así como la cinética de leucocitos y subpoblaciones en sangre periférica. Como muestra la Figura 4.29, tanto la proteinuria, como la secreción de anticuerpos anti-MBG, permanecían invariables a lo largo de la enfermedad tras la administración de Acs anti-CD45. Del mismo modo, el estudio histológico de estos animales mostraban un considerable *infiltrado intersticial*, así como una *inmunofluorescencia positiva* que revelaba el depósito de Acs anti-MBG en los glomérulos (Figura 4.30).

Al realizar el recuento de células blancas de sangre periférica (Figura 4.31A) no mostraban diferencias significativas con respecto al Grupo Cl_2Hg . Del mismo modo, el análisis porcentual de linfocitos periféricos (Figura 4.32) eran similares a los encontrados para el Grupo Cl_2Hg , así como los porcentajes de células portadores del antígeno Ia (Figura 4.31B y C).

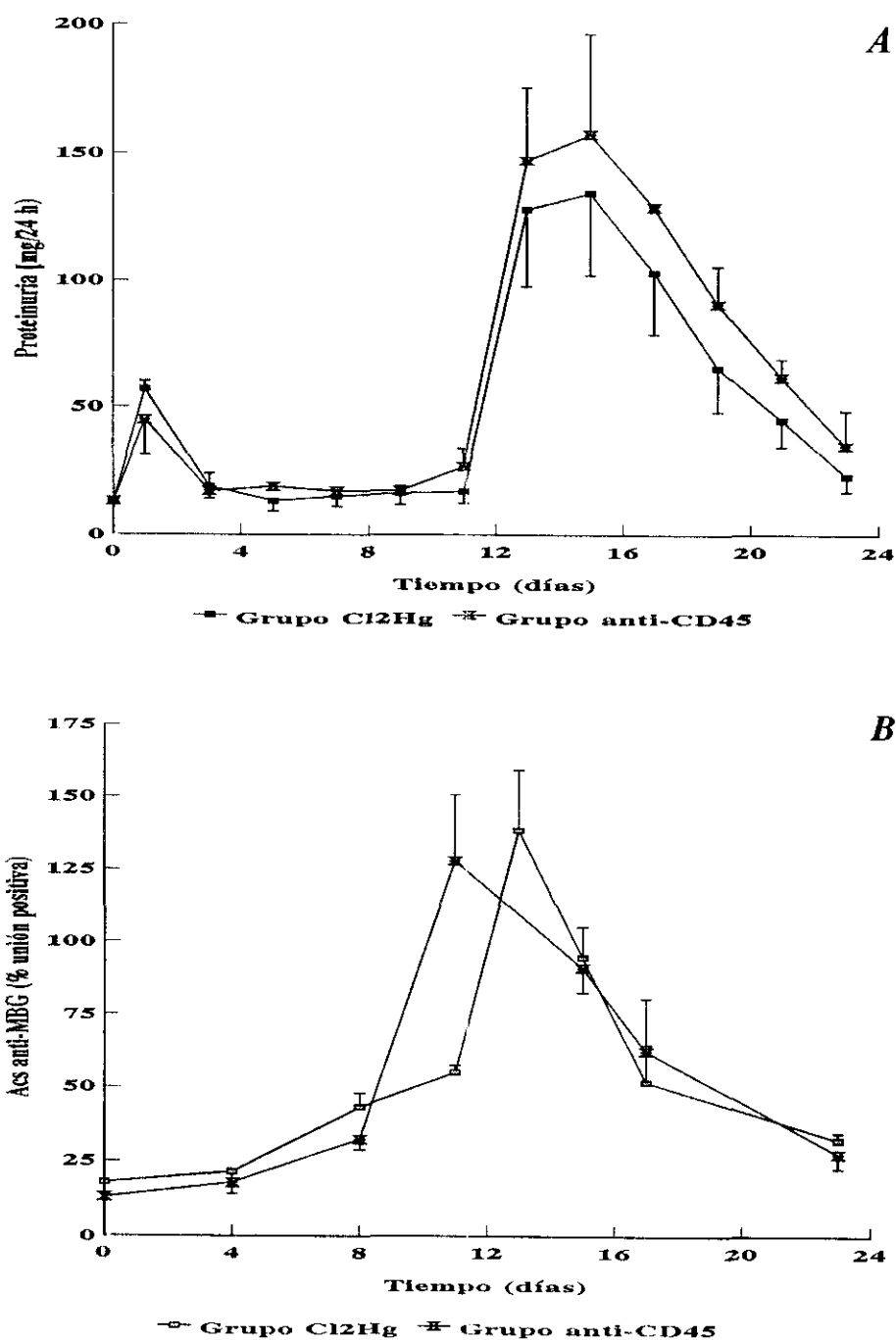


Figura 4.30. Efecto de la administración de anticuerpos anti-CD45 sobre los parámetros de la nefritis autoinmune. El Grupo anti-CD45 no mostraba ninguna diferencia significativa con respecto al Grupo Cl₂Hg, ni en la excreción de proteínas (A), ni en los niveles séricos de anticuerpos anti-MBG (B). Los valores representados corresponden a la media \pm DE de $n=10$ ratas para el Grupo anti-CD45 y $n=25$ para el Grupo Cl₂Hg.

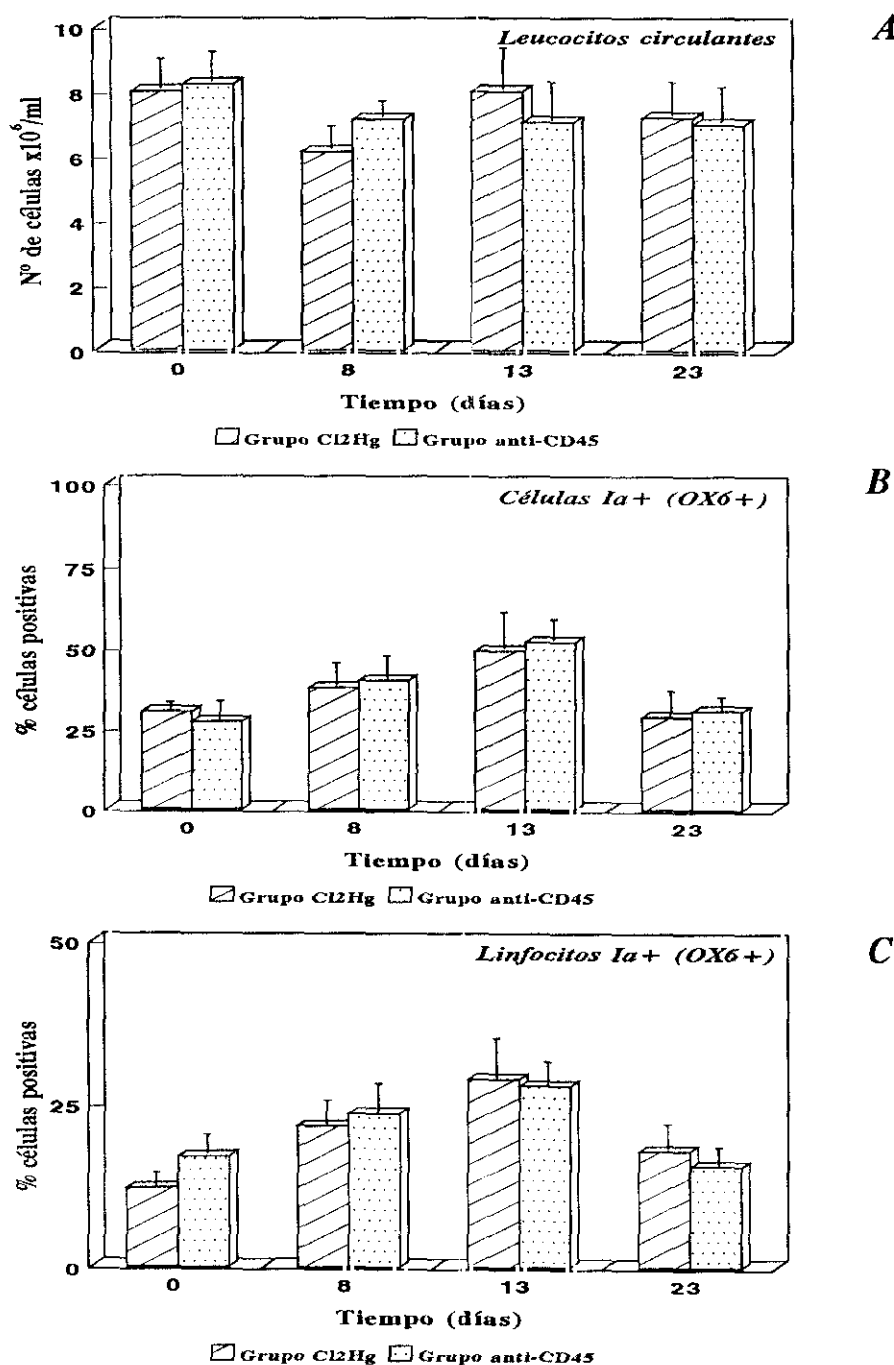


Figura 4.31. Comparación del número total de leucocitos periféricos y de los porcentajes obtenidos por citometría de flujo para el marcador OX6 de los Grupos Cl₂Hg y anti-CD45 (OX1) en sangre periférica. Las gráficas comparan el número total de leucocitos a lo largo de la enfermedad (A), y los valores obtenidos en el estudio de leucocitos periféricos totales (B), así como de linfocitos circulantes (C) entre el Grupo Cl₂Hg y los obtenidos para el Grupo anti-CD45, que sirvieron como control de la administración de los AcMs. Los valores representados en las gráficas han sido obtenidos de la media \pm DE de $n=10$ para el Grupo anti-CD45 y $n=20$ para el Grupo Cl₂Hg.

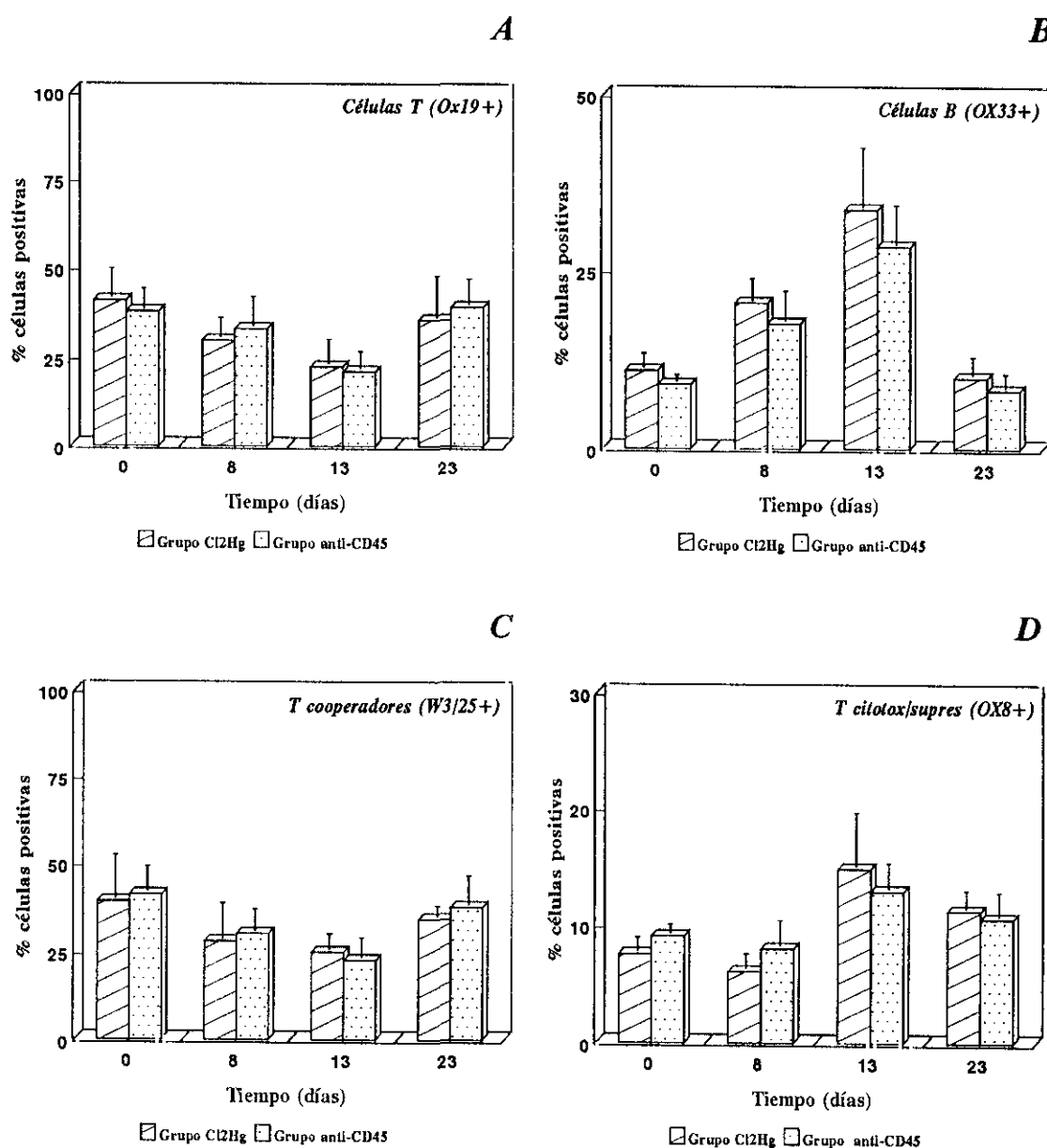


Figura 4.32. Representación de los porcentajes de las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos circulantes de los grupos Cl₂Hg y anti-CD45. Se comparan los valores obtenidos durante la enfermedad para las poblaciones de A) células T (OX19⁺), B) células B (OX33⁺), C) linfocitos T cooperadores (W3/25⁺) y D) linfocitos T citotóxicos/supresores (OX8⁺). Los valores son el resultado de la media \pm DE de n=10 para el Grupo anti-CD45 y n=20 para el Grupo Cl₂Hg.

4.6. PRODUCCION DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

Con el fin de determinar cual era la implicación de la citoquina TNF en la enfermedad, se determinó la existencia de dicha citoquina, tanto a nivel glomerular como a nivel sérico, por medio de un ensayo de viabilidad sobre la línea celular L929 (apartado 3.5.5). Cuando este ensayo se realizó sobre muestras séricas procedentes de los grupos de experimentación, no fuimos capaces de detectar la presencia de TNF en ninguno de los grupos.

Sin embargo, cuando las muestras ensayadas procedían de sobrenadantes de cultivos glomerulares los resultados fueron muy diferentes. Cuando dichos sobrenadantes fueron recogidos del cultivo de los érulos de ratas pertenecientes al Grupo Cl_2Hg y tomados a diferentes días a lo largo del experimento, se comenzó a detectar una presencia de TNF a partir del día 4, aunque no llegó a ser significativa hasta el día 8. El valor máximo se alcanzaba el día 11, llegando a concentraciones de $25,7 \times 10^3 \pm 3,5 \times 10^3$ pg/ml de TNF vs $0,35 \times 10^3 \pm 0,09 \times 10^3$ pg/ml. Como se muestra en la Figura 4.33A, la producción de TNF a partir de glomérulos de ratas tratadas con Cl_2Hg , precedía al desarrollo de la proteinuria.

El mismo tipo de ensayo se realizó para los grupos HP2/1 y anti-TNF α . Los resultados se representan en las gráficas 4.33B y C, respectivamente. En ellas puede observarse cómo los sobrenadantes de cultivos glomerulares procedentes del Grupo HP2/1 no llegaron a alcanzar niveles de TNF en los sobrenadantes lo suficientemente altos como para llegar a ser significativos con respecto al día 0 ($0,886 \times 10^3 \pm 0,166$

$\times 10^3$ pg/ml de TNF). Idénticos resultados se obtuvieron del grupo de animales tratados con Acs anti-TNF α en los que la concentración detectada a día 11 era de $0,569 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$ pg/ml de TNF. Resultaba obvio que, tanto el tratamiento con HP2/1 como con anti-TNF α , conseguía inhibir casi por completo la producción de la citoquina TNF por parte de las células del glomérulo, al igual que ocurría con la proteinuria en ambos casos.

Para descartar la posibilidad de falsos positivos en este experimento que pudieran estar producidos por la presencia en nuestras muestra de endotoxina, citotóxica también para las células L929 utilizadas para el ensayo, se procedió previamente a la detección de endotoxina en todas las muestras ensayadas (apartado 3.5.4). En cualquier caso la concentración de endotoxina presente en nuestras muestras no excedía nunca los 10 pg/ml, límite de sensibilidad de nuestro ensayo.

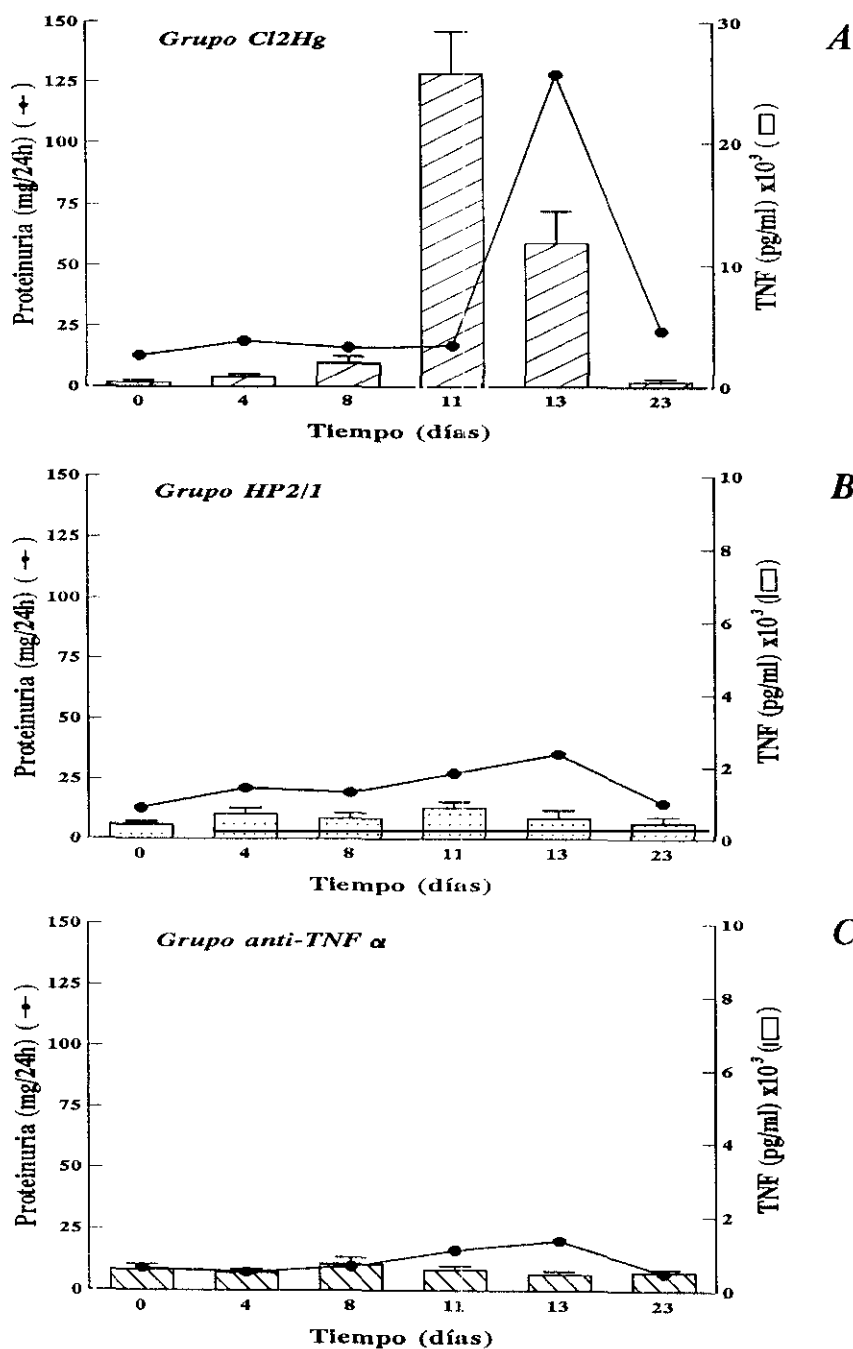


Figura 4.33. Niveles de TNF en sobrenadantes de cultivos glomerulares. A) Los sobrenadantes procedentes de glomérulos de animales pertenecientes al Grupo Cl₂Hg mostraban una alta concentración de TNF, máxima a día 11 de enfermedad. Ni el grupo tratado con HP2/1 (B) ni el tratado con anti-TNF α (C) mostraban niveles significativamente mayores que los obtenidos para sobrenadantes de glomérulos de ratas normales. Los resultados obtenidos para los tres grupos de experimentación son comparados con la cinética de excreción de proteínas de cada uno de ellos. Los valores representados son el resultado de la media \pm DE de n=10 animales por grupo y día.

5. DISCUSSION

5. DISCUSSION

La administración de cloruro de mercurio a ratas de la cepa singénica Brown Norway (BN) produce una enfermedad autoinmune bifásica, con una fase inicial de inducción, en la que se desarrolla la enfermedad, seguida de una fase de autorregulación que provoca la resolución espontánea de ésta a partir de la tercera semana.

El primer síntoma detectado en esta enfermedad es el aumento de los niveles séricos de algunos autoanticuerpos entre los que destacamos los Acs contra el ADN [Weening y col., 1978], mieloperoxidasa [Esnault y col., 1992] y especialmente anticuerpos contra la membrana basal glomerular (MBG) [Sapin y col., 1977], éste último con un marcado carácter nefropático. Así mismo, se puede observar una hipergammaglobulinemia que afecta principalmente a la clase IgE [Sapin y col., 1984; Hirsch y col., 1982].

A nivel renal destaca la aparición de una intensa proteinuria diferenciada claramente en dos fases. En primer lugar una etapa transitoria causada por el efecto tóxico agudo directo del Hg sobre el túbulo renal [Gritzka y Trump, 1968; Aten y col., 1988a]. La necrosis tubular que provoca el mercurio es, por otra parte, rápidamente reparado por mecanismos celulares, como demuestra la presencia de mitosis a partir de las 48 horas, normalizándose totalmente a los 5 ó 6 días. Pasada esta fase transitoria de proteinuria comienza, a partir del día 11, una segunda etapa, de una mayor intensidad y de una duración aproximada de una semana.

El estudio histológico del riñón evidencia la acumulación de linfocitos T y monocitos portadores del antígeno MHC clase II (Ia), localizados en la región perivascular e intersticial, acompañado de un infiltrado glomerular de monocitos, en una primera etapa, y células CD8⁺ después. Se ha especulado mucho a cerca de si el infiltrado intersticial que aparece asociado a la mayoría de las glomerulonefritis experimentales es la causa del daño renal, o por el contrario, es únicamente la consecuencia de éste. En uno de los modelos de glomerulonefritis experimental más estudiado, en el que la nefritis se induce a través de la inyección de anticuerpos heterólogos contra la MBG, conocido como nefritis nefrotóxica, aparece un infiltrado glomerular [Kuhn y col., 1977; Schreiner y col., 1978] y se ha demostrado que tanto el infiltrado inicial, compuesto de leucocitos polimorfonucleares (PMNs), como el infiltrado posterior, caracterizado como células mononucleares, está estrechamente asociado al daño glomerular, y como consecuencia, a la proteinuria [Kreisberg y col., 1979]. Estudios recientes sobre este mismo modelo, concernientes a la evolución del infiltrado leucocitario, revelan que éste se inicia en el hilio capilar del glomérulo, para evolucionar posteriormente a la región periglomerular y por último al intersticio renal [Lan y col., 1991]. Este mismo grupo corrobora, igualmente, la asociación entre infiltrado y proteinuria, puesto que el inicio del primero precede a la lesión glomerular.

La infiltración celular observada en nuestro modelo podría diferenciarse en distintos tipos según su localización en el tejido renal. En primer lugar destaca una acumulación perivascular de leucocitos (células T y monocitos), observado en la

totalidad de los animales sometidos al tratamiento, si bien con diferente grado de intensidad. En segundo lugar, observamos un infiltrado glomerular, compuesto de monocitos y células CD8⁺. Y por último, puede apreciarse un infiltrado con un claro patrón periglomerular, acompañado de un infiltrado intersticial. En la nefritis inducida por la administración de mercurio la infiltración se inicia con la aparición de monocitos en el glomérulo a partir del 4º día de la enfermedad [Aten y col., 1988a]. Ocho días después del inicio del tratamiento aparece un infiltrado esencialmente periglomerular, presentándose las regiones perivasculares y el propio intersticio, prácticamente limpias de células hematopoyéticas. La infiltración mayoritaria de células, tanto en la región perivascular, como en el intersticio, se produce a las dos semanas de la administración del Hg, coincidiendo en el tiempo con el inicio de la proteinuria y los depósitos de Acs en la membrana basal del glomérulo. Parece, entonces, que existen dos tipos diferenciados de infiltrado: un primero que, apareciendo en fases iniciales de la enfermedad, afecta exclusivamente al glomérulo y se extiende a la región periglomerular, en un mecanismo similar al descrito por Lan y col. [1991], y que podría estar contribuyendo también al desarrollo de la proteinuria, al ser temporalmente anterior a ésta. En segundo lugar tendríamos un infiltrado que, al aparecer el día 13 de enfermedad, podría ser causado por el depósito de Ig en la pared glomerular. Es bien conocido que la fijación de anticuerpos a la membrana basal desencadena una serie de reacciones que causarán, en último extremo, la liberación de factores quimiotácticos como la IL-8, el GM-CSF y el TNF, cuyo efecto sobre el endotelio abocará a una masiva migración de células circulantes que invadirán el tejido [Brady, 1994]. Cómo se inicia la acumulación de monocitos en el glomérulo

aún queda por determinar, si bien no parece probable que sea consecuencia del depósito de anticuerpos contra la MBG, puesto que este suceso es temporalmente posterior al inicio del infiltrado. En cualquiera de los casos, el mecanismo de extravasación y migración utilizado por la gran mayoría de los leucocitos que invaden el riñón implica la vía de adhesión VLA-4/VCAM-1, como ha quedado demostrado al evidenciar que más de un 80% de las células circulantes encontradas en el tejido renal expresaban en su membrana el receptor VLA-4 (Figura 4.8).

Por otro lado, cuando analizamos conjuntamente la aparición de depósitos glomerulares de Ig contra la MBG y el desarrollo de proteinuria, sí parece existir una asociación directa entre ambos sucesos. Como ha quedado evidenciado en Resultados (Figura 4.12), al comparar ambas cinéticas, de excreción de proteínas y la que siguen estos mismos animales para la síntesis de autoanticuerpos contra la MBG, esta última precedía al desarrollo de la proteinuria en 2 ó 3 días. Si a este hecho añadimos el estudio realizado a nivel microscópico que revela la aparición de un depósito de Ig de rata en el glomérulo a partir del inicio de la síntesis de Acs contra la MBG y que coincide exactamente con el inicio de la excreción de proteína en orina, podemos especular con la idea de que dichos anticuerpos serían la causa directa de la aparición de proteinuria.

Los múltiples estudios realizados con la finalidad de conocer la causa primaria que desencadena la patogenia renal ha conducido a numerosos grupos a centrar sus investigaciones sobre la producción de autoanticuerpos, especialmente de Acs contra

la MBG. Estudios preliminares demostraron que la administración del mercurio provocaba la activación policlonal de células B de una forma T-dependiente [Hirsch y col., 1982]. Posteriormente se demostraría la proliferación inicial (los primeros días de la enfermedad) de células T autorreactivas, de una forma dependiente del antígeno Ia (MHC clase II). Aunque se ha demostrado que el determinante Ia puede ser modificado por drogas o virus [Gleichmann y col., 1983], este no parece ser el caso del modelo de Hg, ya que existen datos en contra de la teoría de que el Hg modifica determinantes Ia, al evidenciarse que células Ia⁺ normales, pero no células Ia⁺ modificadas, han de estar presentes para que ocurra la proliferación de células T autorreactivas [Pelletier y col., 1986].

Por otra parte, durante la fase de inducción se ha demostrado la coexistencia, junto con la proliferación de células T autorreactivas, de un defecto en los mecanismos de supresión [Bowman y col., 1984; Pelletier y col., 1990]. Sin embargo, mediante experimentos de análisis de dilución límite, se ha demostrado, igualmente, la aparición de células CD8⁺ a partir del día 13-14 de enfermedad (fase autorreguladora). Se evidenciaba, de esta forma, el posible papel de estas células supresoras en la resolución de la enfermedad. Del mismo modo, mediante experimentos de transferencia realizados en animales, sometidos previamente a una deplección de células CD8⁺ [Bowman y col., 1984], se evidenció el papel que dichas células ejercen en la regulación de la enfermedad autoinmune. Esta teoría era nuevamente apoyada por experimentos en los que la transferencia de células esplénicas procedentes del día 13 de enfermedad de ratas BN tratadas eran incapaces de reproducir la enfermedad

en los animales receptores [Pelletier y col., 1985],

Al llevar a cabo el análisis de células periféricas quedó demostrada una disminución progresiva y transitoria del porcentaje de células T a partir de la primera semana, coincidiendo con un aumento del número de linfocitos B. Este último hecho podría dar cuenta de la activación policlonal de células B que se produce en nuestro modelo y que comienza a ser significativamente alta a partir del 8º día de tratamiento, momento en el cual la producción de autoanticuerpos en sangre se hace ya patente. Por otra parte, la disminución encontrada en el número de células T corresponde a una reducción de células T cooperadoras ($CD4^+$). Semejante disminución se ha demostrado en otras enfermedades autoinmunes como el caso de la EAE [Hauser y col., 1984] y en la diabetes en ratas BB [Yale y Marliss, 1984]. En el primer modelo experimental esta caída del porcentaje de células circulantes coincidía con un reclutamiento de dichos linfocitos en el sistema nervioso central. En nuestro modelo existe igualmente una importante infiltración renal de células T cooperadoras que puede dar cuenta de la disminución encontrada en sangre.

Sin embargo, aunque también se produce una entrada importante de células $CD8^+$, en la circulación se aprecia un aumento en su número. Como se comenta previamente, se ha demostrado por diferentes métodos la aparición de esta subclase de linfocitos, coincidiendo con el comienzo de la fase autorreguladora de la enfermedad. El análisis por FACS, donde se detecta su aumento también a partir de la segunda semana de enfermedad, es una evidencia más del posible papel que ejercen

dichas células durante la resolución espontánea de ésta. Es destacable el hecho de que en sangre periférica existe un aumento significativo del número de leucocitos OX6⁺, siendo gran parte de ellas células linfoides. Ha sido ya demostrado que en el modelo de Cl₂Hg uno de los fenómenos iniciales es la interacción T-T dependiente del antígeno Ia [Pelletier y col., 1986]. No es, por consiguiente, extraño el aumento de la expresión del antígeno Ia que se experimenta entre los linfocitos. Actualmente no se sabe sobre qué grupo celular ejerce el mercurio su efecto, ni si lo hace induciendo directamente la activación de células T autorreactivas anti-Ia, aunque parece más probable que ejerza su función a través de la activación de otro grupo de células T que podrían ser las responsables del aumento de la expresión del antígeno Ia que se aprecia entre los linfocitos.

Parece indudable, entonces, que la autoinmunidad inducida por el Cl₂Hg está causada por mecanismos en los que se ven implicados diferentes tipos celulares que, a través de su activación e interacción intercelular, llegan a desencadenar una serie de sucesos que culminarán en el daño tisular.

Una constante que se repite en la década pasada al abordar el tema del tratamiento de enfermedades experimentales en las que la existencia de autoanticuerpos en el suero es lo más relevante en el desarrollo de la enfermedad, y por tanto se ven implicados mecanismos inmunes, es la utilización de agentes inmunosupresores, como ciclofosfamida y más frecuentemente ciclosporina A (CsA). Estos inmunosupresores se han empleado con éxito en el tratamiento de la nefritis

tubulointersticial, en la cual los anticuerpos contra la membrana basal del túbulo renal juega un importante papel [Giménez y col., 1987; Shih y col., 1988]. O como es el caso de la nefritis pasiva de Heymann, que es inducida en la rata tras la administración de anticuerpos dirigidos contra antígenos de la membrana plasmática de células epiteliales glomerulares (Fx1A) [Grönhagen-Riska y col., 1990]. O como nuestro propio modelo de nefritis inducida por mercurio [Baran y col., 1986; Aten y col., 1988b]. También ha sido descrito su efecto en el desarrollo de la glomerulonefritis autoinmune experimental, inducida por la inyección de MBG homóloga en adyuvante completo de Freund (ACF), que si bien provoca la disminución de la proteinuria, no consigue disminuir los niveles de Acs contra la MBG en suero, aunque sí evita su fijación al glomérulo. Igualmente, el tratamiento con CsA ha sido ensayado con éxito en otro tipo de enfermedades autoinmunes que no implican al riñón, como es el caso, por ejemplo, de la diabetes mellitus experimental [Laupacis y col., 1983] y de la encefalomiелitis autoinmune experimental [Feurer y col., 1988].

Sin embargo, este inmunosupresor tan utilizado en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tiene un marcado carácter nefrotóxico, lo que constituye un inconveniente a la hora de su administración. Este efecto se ha comprobado muy frecuentemente en los animales de experimentación sobre los que se ha ensayado su efecto inmunosupresor [Thomson y col., 1989; Kaskel y col., 1988; Whiting y col., 1988]. En humanos es muy utilizado durante el trasplante para evitar el rechazo del injerto. Pero existe un riesgo, no poco frecuente, de encontrar en dichos pacientes un patrón de nefrotoxicidad provocado por la CsA [Morales y col., 1988; Mihatsch y col.,

1985].

El descubrimiento de las moléculas de adhesión, sometidas a un intenso estudio en la última década, proporcionó una nueva perspectiva en el tratamiento de enfermedades autoinmunes en las que se ven implicados mecanismos inmunes. La familia de las integrinas son quizás la más utilizadas, especialmente aquellas capaces de mediar la adhesión célula-célula, participando en la migración leucocitaria. Es el caso de las integrinas $\beta 2$ o integrinas leucocitarias, y el caso especial de la integrina $\alpha 4$ (única de las integrinas $\beta 1$ capaz de mediar la adhesión célula-célula), así como sus respectivos ligandos.

La integrina $\alpha 4$ se ha encontrado asociada a dos diferentes subunidades β . Podemos encontrarla asociada a la cadena $\beta 1$ (integrina VLA-4) [Sánchez-Madrid y col., 1986], o con la cadena $\beta 7$ ($\alpha 4\beta 7$) [Rüegg y col., 1992; Chan y col., 1992]. Hasta el momento todos los datos indican que la integrina $\alpha 4$ juega un importante papel en la extravasación de leucocitos durante procesos de inflamación, así como en mecanismos asociados a respuestas inmunes. La integrina $\alpha 4$ se expresa en un gran número de células hematopoyéticas. Encontramos, así, que células T, B y NK, timocitos, eosinófilos, basófilos, mastocitos y monocitos expresan la integrina $\alpha 4\beta 1$ [revisado en Postigo y col., 1993b]. Entre células no hematopoyéticas la encontramos en células derivadas de la cresta neural [Bednarczyk y McIntyre, 1992] y miotubos [Rosen y col., 1992]. La integrina $\alpha 4\beta 7$ está restringida a leucocitos [Yuan y col., 1990; Erle y col., 1991], encontrándose en linfocitos T y B de sangre periférica [Postigo y

col., 1993c; Schweighoffer y col., 1993]. Ambas integrinas, además, son reguladas durante la activación y diferenciación [Sánchez-Madrid y col., 1986; Postigo y col., 1991].

Las dos integrinas $\alpha 4$ tienen ligandos comunes: fibronectina (región CS-1) [Wayner y col., 1989; Rüegg y col., 1992] y el VCAM-1 [Rice y Bevilacqua, 1989; Rice y col., 1990; Rüegg y col., 1992]. Este último ligando de $\alpha 4$ es un receptor de membrana que pertenece a la Superfamilia de las Inmunoglobulinas [Williams y Barclay, 1988] y que se expresa predominantemente en el endotelio vascular activado. Algunas citoquinas, como la IL-1 α o el TNF α , son capaces de estimular la expresión de esta molécula de membrana [Osborn y col., 1989; Rice y Bevilacqua, 1989]. En virtud a su unión con los respectivos ligandos, la integrina $\alpha 4$ estará implicada en diferentes procesos, como la diferenciación de progenitores linfoides [Williams y col., 1991], proliferación de células T [Nojima y col., 1990] o incluso el desencadenamiento de señales intercelulares, como la fosforilación de proteínas, [Nojima y col., 1992; Freedman y col., 1993] en el caso de su unión con la fibronectina (FN). Como ya se ha comentado arriba, su unión al VCAM-1 le permite jugar un papel central en la extravasación de leucocitos a los lugares de inflamación [Hemler, 1990]. Las integrinas $\alpha 4$ se han asociado con la adhesión intercelular, que implica probablemente un ligando diferente de VCAM-1 y FN [Campanero y col., 1990, 1992; Bednarzyck y McIntyre, 1990; Pulido y col., 1991]. Por último, se ha identificado un nuevo ligando para $\alpha 4\beta 7$ (MadCAM-1) que se encuentra expresada en la superficie de vénulas de endotelio alto en las placas de Peyer [Briskin y col., 1993].

La unión del VCAM-1 a sus receptores ($\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$) es capaz de modularse por activaciones a corto plazo [Shimizu y col., 1992; Postigo y col., 1992]. Durante esta activación no se observa un cambio en los niveles de expresión del VLA-4 o del $\alpha 4\beta 7$, lo que parece indicar que estas moléculas sufren cambios conformacionales durante la activación celular [Arroyo y col., 1992; Faull y col., 1993; Rüegg y col., 1992]. Al igual que ocurre con la ruta de adhesión mediada por LFA-1/ICAM-1, la interacción VLA-4/VCAM-1 es esencial en la respuesta inmune e inflamatoria, situaciones en las que adquiere especial importancia la unión entre células circulantes y endotelio. Estas vías de adhesión van a fortalecer la unión inicial, mediada por selectinas, entre ambos tipos celulares [Butcher, 1991; McEver, 1992]. De esta forma el complejo VLA-4/VCAM-1 se ve implicado en numerosos procesos inflamatorios, teniendo, por tanto, un papel central en numerosas enfermedades (apartado 1.4 de Introducción).

Este hecho destacado hace de los anticuerpos específicos para el $\alpha 4$, así como para el VCAM-1, métodos terapéuticos ideales para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Con esta finalidad se ha ensayado en numerosos modelos experimentales donde la inflamación tuviera un papel central en el desarrollo de la enfermedad. Ha sido ensayado con éxito el tratamiento con Acs anti- $\alpha 4$ en la EAE [Yednock y col., 1992], en reacciones alérgicas [Weg y col., 1993; Chisholm y col., 1993], en el modelo de nefritis nefrotóxica, donde se observa un depósito de Ig en el glomérulo como consecuencia de la administración de anticuerpos heterólogos contra la MBG [Mulligan y col., 1993a], así como en lesiones pulmonares causadas por el depósito de complejos inmunes [Mulligan y col., 1993b y c].

Del mismo modo, la utilización de AcMs contra otras moléculas de adhesión implicadas en la migración de leucocitos han sido empleadas con idéntica intención. Así, en un modelo experimental de nefritis autoinmune desarrollada en el ratón, el tratamiento con anticuerpos dirigidos contra la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), ligando de LFA-1, impide la infiltración de leucocitos al riñón, evitando además la aparición de proteinuria [Harning y col., 1992]. En un estudio realizado sobre el modelo de nefritis nefrotóxica [Mulligan y col., 1993a] los autores emplearon un amplio panel de Acs contra diferentes moléculas de adhesión, consiguiendo una considerable reducción de la proteinuria al tratar con Acs contra el Mac-1, el ICAM-1 y el VLA-4, y en menor medida con el ELAM-1. Sin embargo, la administración de Acs contra el LFA-1 no consiguió reducir los niveles de proteinuria. Posteriormente, Kawasaki y col. [1993] consiguieron resultados positivos con el tratamiento, tanto con Acs contra el ICAM-1 como contra el LFA-1, en un modelo de nefritis nefrotóxica.

En nuestro caso, la elección de un Ac contra la integrina $\alpha 4$ para el tratamiento de este modelo de enfermedad autoinmune se realizó en base al estudio hecho sobre el tejido renal de ratas a las que se les indujo la enfermedad ya que evidenciaba la gran proporción de células VLA-4⁺ que infiltraban el riñón. Existían además trabajos preliminares realizados con el mismo anticuerpo (HP2/1) en casos de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) [Yednock, 1992], en el que se demostraba una alta proporción de éxito en la prevención de dicha autoinmunidad.

El tratamiento adicional con HP2/1 a ratas inyectadas con Cl₂Hg previno la

infiltración de células circulantes en el foco de lesión, evidenciándose una ausencia prácticamente total de leucocitos en el intersticio renal de este grupo de ratas. Al tratarse de un AcM dirigido contra un receptor de membrana expresado en un amplio número de células hematopoyéticas, podríamos estar produciendo, con su administración, una deplección leucocitaria en sangre, cuyo reflejo fuera la ausencia de infiltrado en el riñón. Sin embargo, el análisis del número total de células blancas en el Grupo HP2/1, así como en los Grupos Control y Cl₂Hg, demostró no existir ninguna diferencia significativa entre ninguno de los grupos. El efecto conseguido tras la administración de Acs anti- α 4 demostraba la importancia de la ruta de adhesión VLA-4/VCAM-1, siendo esta la vía preferente de extravasación y migración de leucocitos.

Sin embargo, además del efecto protector de los AcMs contra la integrina α 4 sobre el infiltrado intersticial, el efecto más sorprendente encontrado sobre este modelo se refería a la producción de anticuerpos anti-MBG que se observa en este modelo de autoinmunidad experimental. La administración del AcM a ratas tratadas con Cl₂Hg conseguía reducir en un 80% los niveles séricos de Acs contra la MBG. Este efecto, además, se evidenciaba a nivel renal en una ausencia de depósitos glomerulares de Ig, así como en una dramática reducción de la proteinuria. La realización de un experimento de transferencia pasiva en el Grupo HP2/1, a cuyas ratas se les administró suero procedente de ratas tratadas con Cl₂Hg, nos permitió dissociar los efectos conseguidos tras la administración de HP2/1. Se ha discutido anteriormente que existe un mecanismo que describe una cascada de sucesos que se

inician a partir de la fijación de anticuerpos a la membrana basal. En este caso, una reducción en el depósito de Acs en el glomérulo podría ser la causa de la ausencia de infiltrado y no el bloqueo de la unión VLA-4/VCAM-1, conseguido tras la administración de Acs anti- $\alpha 4$. Sin embargo, la administración pasiva de Acs anti-MBG a este grupo experimental demostró que, a pesar de la existencia de depósitos glomerulares que pudieran iniciar el influjo de células circulantes, los Acs anti- $\alpha 4$ estaban impidiendo dicho extravase leucocitario.

Estos mismos experimentos de transferencia nos permitieron definir la probable causa inicial de la proteinuria. Si bien se ha demostrado en otros modelos de glomerulonefritis que el influjo inicial de monocitos en el glomérulo puede iniciar una cascada de sucesos que culminen en el daño glomerular, y por consiguiente en la proteinuria [Kreisberg y col., 1979; Lan y col., 1991], el infiltrado observado en nuestro modelo, consecuencia de la fijación de Ig a la membrana basal, no parece tener ningún efecto sobre el desarrollo de la proteinuria. Como demuestran los experimentos de transferencia pasiva de suero procedente del día 13 de enfermedad de ratas BN que recibieron el tratamiento con Cl_2Hg , su administración a ratas normales les indujo, además de depósitos de Ig en los glomérulos, el desarrollo de un infiltrado. Sin embargo, la administración del suero al Grupo HP2/1 demostró la independencia de ambos sucesos, esto es, dichos animales mostraban la existencia de depósitos glomerulares de Ig, pero no se encontró en ningún caso células inflamatorias, aunque sí desarrollaron proteinuria, si bien no tan intensa como el Grupo Cl_2Hg . Parece, entonces, que la causa inicial de proteinuria era el depósito de

anticuerpos en la membrana basal del glomérulo, que en definitiva causaría el daño en la barrera de filtración glomerular. En cualquier caso parece evidente que la acumulación de células en el riñón no tiene una implicación directa con el desarrollo de la proteinuria, antes bien, sería una consecuencia, al igual que la proteinuria, del depósito de Acs, sin tener una implicación directa en el desarrollo de ésta. Como se ha discutido arriba, parece existir un infiltrado en días tempranos tras la inyección de la primera dosis, que aunque también es dependiente de VLA-4/VCAM-1, no parece ser la causa de la existencia de anticuerpos anti-MBG. Este infiltrado, que consiste principalmente en monocitos, sí podría contribuir de alguna manera al daño glomerular, de forma idéntica al mecanismo descrito por Lan y col. [1991].

El tratamiento con HP2/1 pone en evidencia las funciones conocidas atribuidas al VLA-4: por un lado su papel en la extravasación de leucocitos, a través de la unión de dicha molécula a su ligando en el endotelio (VCAM-1) y la posterior migración a la zona de inflamación, vía su unión a la FN. De igual modo, queda confirmada la especificidad de los efectos provocados por HP2/1 sobre la enfermedad al compararlo con los nulos efectos que causa el tratamiento con el monoclonal irrelevante empleado, OX1, (dirigido contra el antígeno leucocitario común). Queda igualmente demostrado que en esta enfermedad autoinmune la vía dominante de extravasación y migración utilizada por los leucocitos parece ser la ruta VLA-4/VCAM-1. Este hecho puede explicar la ausencia en este modelo de leucocitos polimorfonucleares que infiltren el riñón puesto que esta molécula de adhesión (VLA-4) no se expresa en dicho grupo celular. El hecho más destacado en los modelos de glomerulonefritis, en

los que el desarrollo de proteinuria está estrechamente asociado con el infiltrado, como es el caso de la nefritis nefrotóxica, es la demostración de un importante influjo de leucocitos polimorfonucleares que van a iniciar los mecanismos de lesión glomerular [Kreisberg y col., 1979]. Podría ser significativo, a este respecto, el que no se produzca un acúmulo de células PMNs en nuestro modelo.

El mecanismo por el cual el AcM contra VLA-4 es capaz de inhibir la síntesis de autoanticuerpos contra la MBG queda aún por determinar. Teniendo en cuenta el mecanismo que provoca la síntesis de estos autoanticuerpos, esto es, la activación policlonal de células B a partir de células T autorreactivas, cabe suponer la posibilidad de que exista una interacción entre ambas células que desencadene la activación de las células B. Aunque parece existir una previa interacción T-T dependiente del antígeno Ia, no parece probable que HP2/1 esté interfiriendo a este nivel previo de activación ya que hemos podido demostrar que el tratamiento con el Ac contra la integrina $\alpha 4$ no es capaz de inhibir la producción de otro tipo de anticuerpos como son los Acs anti-ADN. Existen múltiples evidencias *in vitro* que proponen una nueva función de la integrina $\alpha 4$ que no depende de su unión ni al VCAM-1 ni a la fibronectina, sugiriendo un tercer ligando para este receptor, aún desconocido [Campanero y col., 1990, 1992; Bednarczyk y col., 1990; Pulido y col., 1991; Rüegg y col., 1992]. La inhibición, a nivel de producción de anticuerpos anti-MBG, podría ser una evidencia *in vivo* de esta nueva función de VLA-4 en la interacción entre células linfoides. El bloqueo de dicha unión evitaría, de alguna forma, la activación de las células productoras de autoanticuerpos. Como ya se ha comentado, los Acs contra el

ADN no sufren ninguna variación fruto del tratamiento con el Ac HP2/1. Este hecho nos sugiere un papel inmunosupresor selectivo del Ac HP2/1. Obviamente está actuando de forma diferencial sobre distintos clones productores de anticuerpos. Podríamos especular sobre la existencia de distintos clones de células B en virtud a una activación dependiente o no de la integrina $\alpha 4$.

Según esta teoría, esquematizada en la Figura 5.1, estaríamos actuando sobre un punto muy concreto del proceso de activación que lleva a la producción, en último extremo, de autoanticuerpos. Esta misma teoría podría explicar el porqué en los animales tratados con el Ac HP2/1 no se observa una reducción en el número de células que expresan el antígeno Ia con respecto al Grupo Cl₂Hg, siendo, en algunos casos incluso superior. Sin embargo, es indudable que se produce una inhibición de la síntesis de anticuerpos contra la MBG. No podemos descartar, incluso admitiendo la posibilidad de una expresión de genes de citoquinas, que la administración del Ac HP2/1 está bloqueando su unión a sus ligandos naturales. Sería posible que para que se lleve a cabo la activación de células B sea necesario un contacto celular entre las células T autorreactivas y las células B. Al bloquear dicho contacto estaríamos evitando la síntesis de estos anticuerpos.

Por otra parte, ya hemos comentado la importancia que las células T citotóxicas/supresoras podrían estar jugando en la resolución de la enfermedad. Esta fase autorreguladora comienza a partir del día 13, cuando todos los parámetros de la enfermedad comienzan a descender. Es entonces cuando comienza un considerable

aumento de células CD8⁺ en sangre, iniciando, así, su papel regulador. Además se puede observar en este mismo grupo de ratas, que en días previos se experimenta, sin embargo, una reducción de dichas células, lo que se ha interpretado como un defecto en los mecanismos inmunosupresores de estos animales consecuencia de la administración de mercurio. Cuando tratamos a las ratas BN con el Ac anti- α 4 no sólo no se observa tal reducción en los porcentajes de células CD8⁺, sino que experimenta un importante incremento con respecto al Grupo Cl₂Hg. Este aumento inicial en el número de células CD8⁺ podría estar influyendo en una temprana regulación de la enfermedad, sumándose a los efectos ya discutidos del Ac contra la integrina α 4.

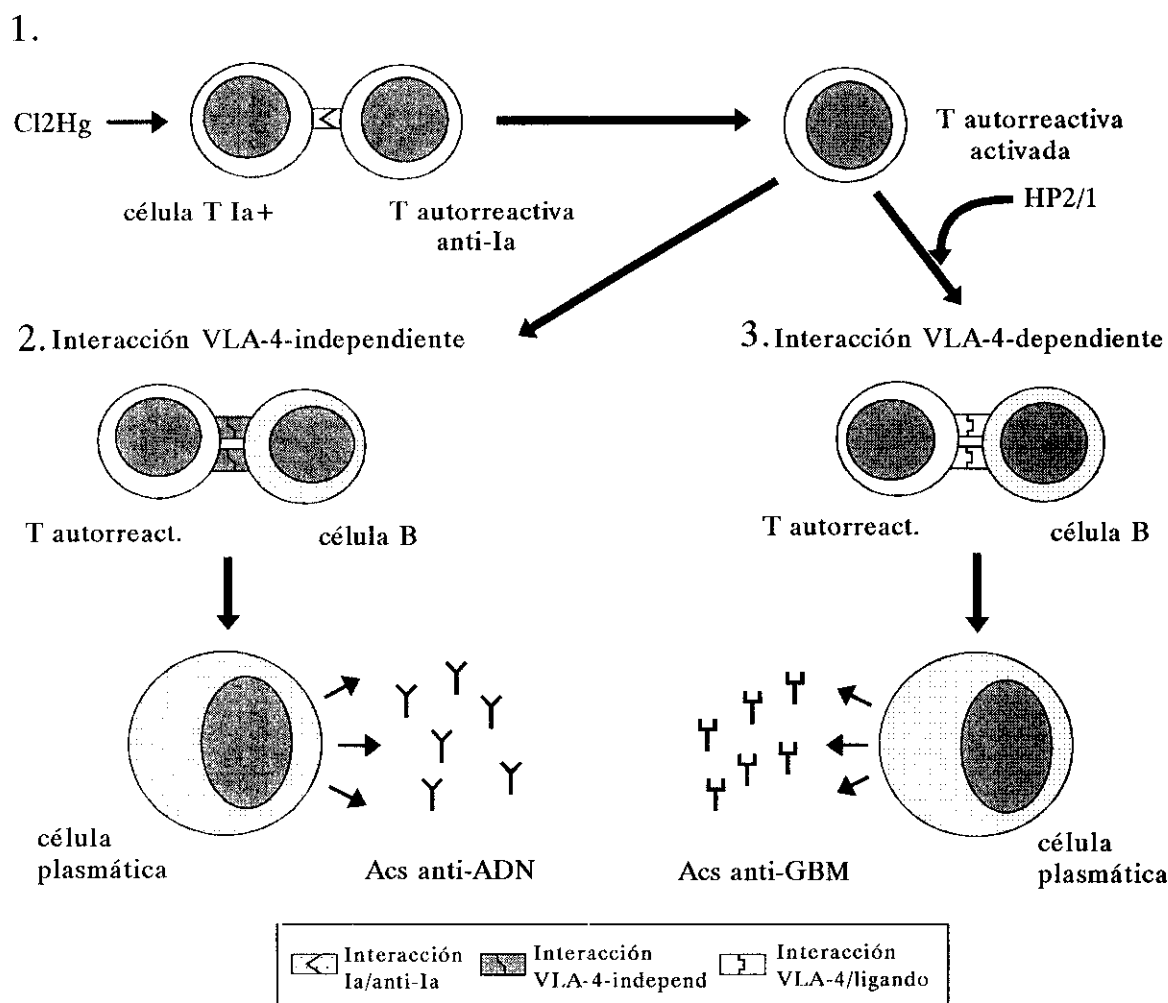


Figura 5.1. Hipótesis sobre la activación celular y síntesis de autoanticuerpos. 1. El Cl₂Hg actuaría sobre un subtipo de células T induciendo en ellas la expresión de moléculas Ia. Estas células T Ia⁺ interaccionarían con un subgrupo de células T autorreactivas anti-Ia que, debido a un defecto en los mecanismos supresores, escaparían al control de células T citotóxicas/supresoras. La interacción de las células T resultantes (T autorreactivas activadas) con diferentes clones de células B inducirían su activación. Esta interacción podría ser de dos tipos: 2. Una interacción independiente de la integrina $\alpha 4$, que se produciría entre un determinado tipo de clones B y que daría como resultado la producción de un tipo de anticuerpos (como es el caso de los Acs contra el ADN), y 3. una segunda clase de interacción que sería dependiente de la integrina $\alpha 4$, produciéndose una adhesión intercelular mediada por la unión de $\alpha 4$ a su posible ligando expresado en linfocitos. Esta interacción daría como resultado la síntesis de otro tipo de autoanticuerpos (como el caso de Acs contra la MBG).

Es indudable que en nuestro modelo de nefritis autoinmune las moléculas de adhesión, en especial la integrina $\alpha 4$ y su ligando VCAM-1, contribuyen de forma decisiva a la patología renal. No podemos olvidar, por tanto, los mecanismos reguladores a los que dichos receptores están sometidos. Una parte importante de dicha regulación corre a cargo de factores quimiotácticos y citoquinas. En situaciones fisiológicas normales, tanto las células circulantes como el endotelio, han de mantener un estado de inactivación, permaneciendo en una forma "anti-adherente". Durante la enfermedad, los mediadores inflamatorios jugarán un papel crítico al regular la adhesión, bien alterando la afección y/o expresión de receptores ya existentes en membrana, o bien provocando su síntesis *de novo*. Factores quimiotácticos (como el C5a o el LTB₄) y citoquinas (como la IL-8, el MCP-1 o el TNF α) son capaces de aumentar rápidamente la adhesividad de los leucocitos a las células endoteliales, incluso a células endoteliales glomerulares [Arnaout, 1990; Brady y Serhan, 1992] y a células mesangiales [Brady y col., 1992]. El perfil de las moléculas de adhesión expresado será diferente dependiendo del patrón de citoquinas que intervengan, así como del tipo celular sobre el que se esté actuando. Citoquinas como el TNF α , la IL-1 β y el IFN-gamma aumentan la síntesis del ICAM-1 en células endoteliales y en el endotelio glomerular [Pober y Cotran, 1990; Brady y Serhan, 1992] y desencadenan la síntesis *de novo* en el mesangio [Denton y col., 1991]. El TNF α y la IL-1 β también son capaces de inducir la síntesis del VCAM-1 en el endotelio glomerular, el mesangio y el epitelio tubular [Wuthrich y Snyder, 1992]. Además, estas moléculas inducen transitoriamente la expresión de la E-selectina en las células endoteliales [Lasky, 1992].

En situaciones de enfermedad estos receptores de membrana y sus ligandos adquieren una gran importancia, lo que confiere un papel central, igualmente, a los mediadores inflamatorios que modulan la expresión y activación de tales moléculas. Se convierten, así, las citoquinas en candidatos perfectos encaminados al tratamiento de ciertas enfermedades con un importante componente inflamatorio. Han sido utilizados en innumerables ocasiones anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, dirigidos contra algunas de las citoquinas más frecuentemente implicadas en los procesos inmunes. Así, en el modelo de nefritis nefrotóxica el tratamiento con anticuerpos contra el $\text{TNF}\alpha$ y la $\text{IL-1}\beta$ por separado, conseguían anular los efectos provocados por la inyección de Acs contra la MBG y el LPS. Este efecto no se evidenció cuando se les administraba a los animales Acs contra la $\text{IL-1}\alpha$ [Karkar y col., 1992]. En un modelo similar, sin la inyección adicional de LPS, Mulligan y col. [1993a] corroboraron los resultados de Karkar y col. demostrando la efectividad del tratamiento con Acs contra el $\text{TNF}\alpha$ (y ningún efecto con la IL-1), tanto a nivel de excreción de proteínas en orina, como en la infiltración de glomérulos por neutrófilos, mostrando una vez más el papel del $\text{TNF}\alpha$ en la nefritis inducida por Acs contra la MBG.

En la nefritis autoinmune inducida por mercurio la administración de un antisuero anti- $\text{TNF}\alpha$ consigue una sorprendente reducción de los niveles de proteína en orina. El mecanismo de acción del $\text{TNF}\alpha$ es, sin embargo, muy diferente al que hemos descrito para el Ac anti- $\alpha 4$. Los efectos conseguidos con el tratamiento con Acs anti- $\text{TNF}\alpha$ nos hace pensar en un mecanismo de acción exclusivamente local para esta

citoquina. En los animales que recibieron tal tratamiento no fue detectado ningún descenso en los niveles séricos de autoanticuerpos. Del mismo modo, los glomérulos de estas ratas mostraban un patrón de depósitos de Ig semejante al Grupo Cl₂Hg. El hecho de que la administración de Acs anti-TNF α no tenga ningún efecto sobre la síntesis de autoanticuerpos podría apoyar la teoría expuesta anteriormente en la que suponemos crucial el contacto celular para que se produzca la activación y diferenciación de células B. Sin embargo, aunque la administración de Acs anti-TNF α parece estar afectando a la activación celular al observarse un pequeño descenso en el porcentaje de expresión del antígeno MHC clase II con respecto al Grupo Cl₂Hg, no parece probable que dicha disminución, que por otra parte no es muy significativa, afecte a las células B ya que esta población experimenta un fuerte aumento en su número en el Grupo anti-TNF α . Si a esto añadimos que en el suero de animales tratados con Cl₂Hg no se detecta la presencia de esta citoquina, podemos descartar la posible implicación del TNF α en la fase de inducción de la enfermedad. Teniendo en cuenta el trabajo de Yurochko y col. [1992] que describen la expresión de algunos genes de citoquinas tras la unión de la integrina $\alpha 4$ con Acs dirigidos contra ella (incluso HP2/1), buscamos el posible incremento de TNF en el suero de ratas tratadas con anti- $\alpha 4$ sin encontrar niveles significativos. Aunque no podemos descartar que esta expresión génica de citoquinas, consecuencia del compromiso integrina $\alpha 4$ /Ac anti- $\alpha 4$, esté teniendo lugar, no parece afectar al gen para el TNF, antes bien afectaría a otra serie de citoquinas que por otro lado podrían estar contribuyendo al ligero aumento de expresión de moléculas Ia que se detecta en el análisis de leucocitos periféricos del Grupo HP2/1.

Los ensayos realizados con el fin de detectar también un aumento de TNF en el suero de los animales inyectados con Cl_2Hg fueron, en cualquier caso, negativos. Esto hacía pensar nuevamente en la posibilidad de un papel exclusivamente local del TNF en esta enfermedad. La detección de niveles altos de TNF en el sobrenadante de cultivos glomerulares procedentes de diferentes días del Grupo Cl_2Hg parecía confirmar esta teoría. Esta síntesis de TNF comenzaba a detectarse a partir del día 4 y se hacía máxima el día 11 de enfermedad. Como hemos comentado anteriormente, se produce un acúmulo inicial de monocitos en el glomérulo, significativo a partir del día 4 y que es máximo el día 8. Es bien conocido que dichos monocitos pueden ser una fuente importante de TNF [Oppenheim y col., 1991]. El efecto de esta citoquina sobre el endotelio y sobre las células del propio glomérulo contribuye al reclutamiento de nuevas células circulantes. El TNF es un importante activador del VCAM-1 por lo que el bloqueo de su acción podría evitar la activación de dicho receptor de células endoteliales. De hecho, en los animales tratados con Acs anti-TNF α no se produce el infiltrado celular. Como se ha demostrado ya, este infiltrado es dependiente de la adhesión VLA-4/VCAM-1, por lo que la producción inicial de TNF en los glomérulos (probablemente a partir de los monocitos infiltrantes) parece ser esencial en el desarrollo de la nefritis al iniciar una cascada de activación y secreción de nuevos mediadores solubles.

Aunque no existe una evidencia directa de cual es el tipo celular que inicia la secreción de TNF, podría ser que dicha producción corriera a cargo de células glomerulares intrínsecas por un posible efecto directo del Cl_2Hg sobre ellas,

induciéndose secundariamente su activación. El candidato perfecto sería el macrófago residente aunque no puede descartarse el posible papel de las células mesangiales [Baud y col., 1989] e incluso de las células epiteliales glomerulares [Gómez-Chiarri y col., 1990]. La secreción de TNF iniciada por estas células, que ocurriría el 4º día de la enfermedad, reclutaría nuevas células desde la circulación, principalmente monocitos, que contribuirían nuevamente a la síntesis de TNF. Cuando fueron medidos los niveles de TNF existente en sobrenadantes de cultivos glomerulares de ratas tratadas con Acs anti- $\alpha 4$ no fueron detectados niveles significativos. Este resultado viene a indicar que la mayor producción de TNF depende de las células que infiltran el glomérulo. Aunque se produzca la secreción de pequeñas cantidades de TNF por parte de macrófagos residentes, a unos niveles insuficientes para ser detectado en el medio, esta citoquina no es capaz de desencadenar el influjo masivo de monocitos al riñón puesto que la vía de extravasación principal en este modelo está bloqueada por el efecto del tratamiento con Acs anti- $\alpha 4$. Con la inhibición de la síntesis de TNF, así como el bloqueo de su función, estamos evitando una cascada de sucesos que van a contribuir, junto con el depósito de Acs anti-MBG en el glomérulo, a la entrada de células circulantes y al daño producido en la barrera de filtración. En la Figura 5.2 se esquematiza la posible implicación del TNF en la lesión renal, así como de la integrina $\alpha 4$. El papel del TNF como factor quimiotáctico y activador de las moléculas de adhesión queda patente tras observar la ausencia total de células infiltrantes en los animales tratados con anti-TNF α . Sin embargo, como ya quedara demostrado anteriormente, la presencia de células infiltrantes no es causa desencadenante de la proteinuria. Esto implica que el TNF, además de contribuir

decisivamente en el desarrollo del infiltrado, tanto intersticial como glomerular, tiene igualmente una implicación directa sobre el daño glomerular, y por consiguiente sobre la barrera de filtración. Los mecanismos que inician este daño tras la fijación de anticuerpos a sus determinantes antigénicos propios de la membrana basal, no están muy bien definidos. La fijación de inmunoglobulinas parece desencadenar la producción de agentes quimiotácticos, y se ha demostrado que muchas Igs pueden fijar complemento, generando el péptido quimiotáctico C5a [Brady, 1994]. Pero la fijación de complemento parece ser un mecanismo más frecuente en el caso de nefritis por complejos inmunes circulantes. En el modelo de nefritis inducida por Cl_2Hg no se producen complejos circulantes sino anticuerpos contra un componente fijo de la membrana basal. Pueden generarse especies oxígeno-reactivas, enzimas proteolíticas y moléculas citotóxicas cuya liberación causa la lesión. Entre estas moléculas parece tener un papel central el TNF. Sin embargo, los mecanismos concretos que se desencadenan tras la fijación de Acs a la MBG no son muy bien conocidos, requiriéndose aún múltiples estudios encaminados a su discernimiento.

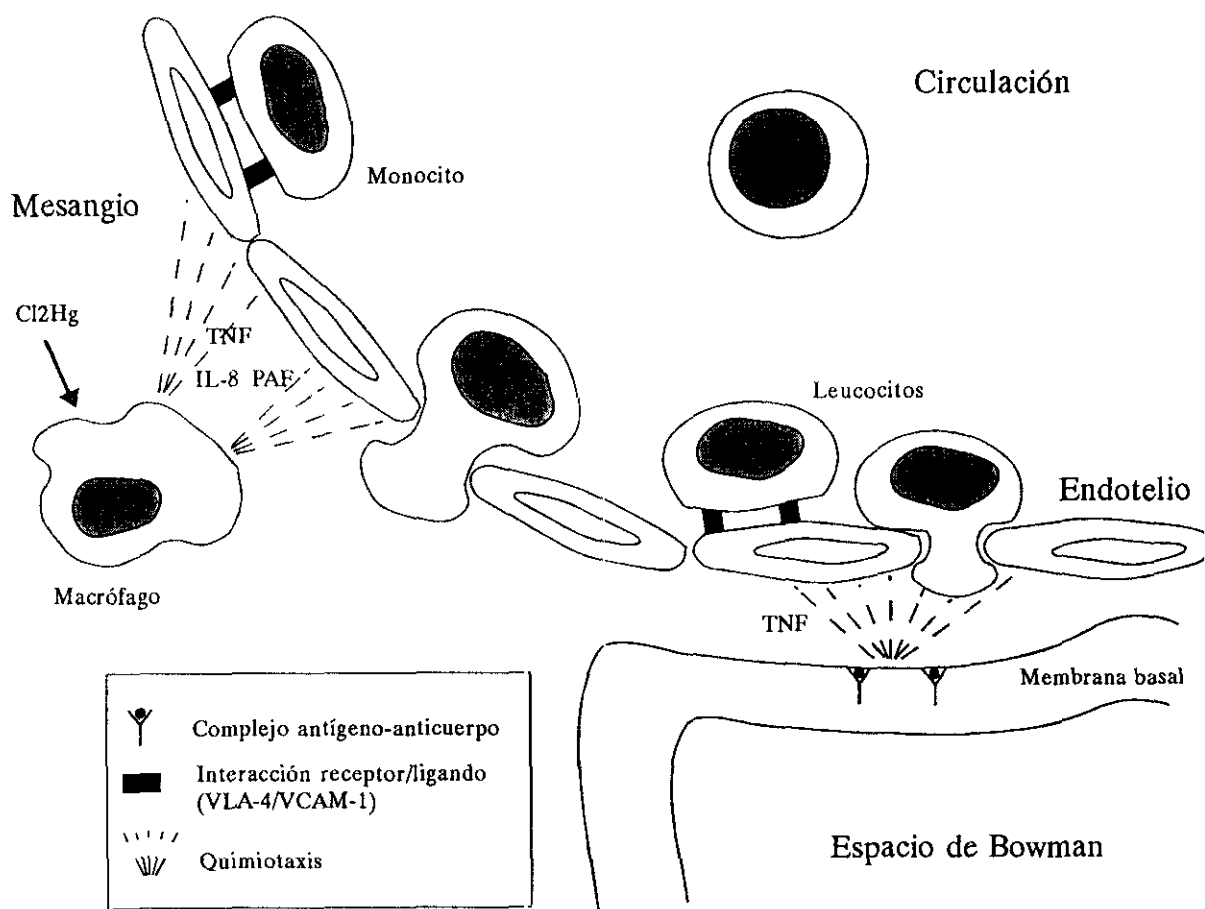


Figura 5.2. Esquema hipotético del inicio del daño glomerular. La activación de los macrófagos residentes (probablemente por un efecto directo del mercurio) provocaría la secreción de factores quimiotácticos y citoquinas, como el $\text{TNF}\alpha$ (con un marcado carácter quimiotáctico también) que iniciarían el reclutamiento de monocitos desde la circulación, induciendo la activación o expresión *de novo* de moléculas de adhesión, como el VCAM-1. En otro término, el depósito de Ig en la membrana basal del glomerulo desencadenaría una serie de sucesos en cascada en los que la generación de factores quimiotácticos, citoquinas (TNF), y moléculas citotóxicas, jugarían un papel esencial provocando la entrada de células desde la circulación de una forma VLA-4/VCAM-1-dependiente pudiendo, además, contribuir decisivamente a provocar el daño en la barrera de filtración glomerular, causando el paso indiscriminado de moléculas a la orina.

A pesar de que todas las evidencias parecen indicar que en nuestro modelo el TNF no tiene ninguna implicación en la inducción de la enfermedad, uno de los efectos que se consiguen tras la administración de Acs contra el TNF α se puede observar en la sangre al analizar los porcentajes de células CD8⁺. Al igual que ocurría en el Grupo HP2/1, y a diferencia del Grupo Cl₂Hg, aparecía un importante incremento de esta subclase linfocitaria durante la fase de inducción. Se ha sugerido en este modelo un defecto en la función T supresora durante esta fase [Pelletier y col., 1988b] que es repuesta durante la fase reguladora [Bowman y col., 1987] por la acción de la IL-2 [Castedo y col., 1994]. El papel que tienen tanto el TNF como la integrina $\alpha 4$ en este suceso, bien contribuyendo al defecto de la función T supresora, o bien durante el restablecimiento de dicha función, es algo que debe ser estudiado más profundamente.

Aún queda mucho por conocer, tanto de los mecanismos que inducen la activación de las células B y la síntesis de autoanticuerpos, especialmente de aquellos que autorregulan la enfermedad, como del daño tisular que se desencadena como consecuencia de la aparición de algunos de estos autoanticuerpos. Sin embargo, después de los estudios realizados ha quedado demostrada la implicación, en ambos sucesos, de la adhesión célula-célula y célula-MEC, en cuyo proceso tienen una evidente importancia, tanto la integrina $\alpha 4$ y sus ligandos, como la actuación de mediadores solubles, como la citoquina TNF, cuya principal función parece centrarse a nivel local. Ambas moléculas, el TNF y la integrina $\alpha 4$, a niveles diferentes, deben ser considerados como candidatos adecuados para el diseño de terapias

inmunosupresoras en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La administración de cloruro de mercurio a ratas Brown Norway les produce una enfermedad autoinmune. Los animales inyectados desarrollan una primera fase de inducción, caracterizada por la aparición en el suero de altos niveles de autoanticuerpos, destacando anticuerpos contra los determinantes antigénicos de la MBG. Durante esta fase se observa un aumento de células B en la sangre, consecuencia de la activación policlonal de células B dependiente de células T y cuyo resultado será la síntesis de anticuerpos.

2. La acción tóxica directa del mercurio sobre el riñón causa la degeneración de las células del epitelio tubular cuya consecuencia es la aparición transitoria de proteinuria.

3. El depósito glomerular de Ig (Acs contra la MBG) desencadena la lesión glomerular cuyos efectos se traducen en la aparición de un intenso acúmulo de células hematopoyéticas, tanto en el intersticio renal como en los glomérulos, y de una grave proteinuria, con una duración aproximada de una semana.

4. Con la aparición en la circulación de un aumento de células T CD8⁺ se inicia la fase de autorregulación de la enfermedad que se caracteriza por el aclaramiento de los anticuerpos en el suero y la resolución de la proteinuria, siendo aún persistente el infiltrado celular renal.

5. La administración a ratas tratadas con Cl_2Hg del AcM HP2/1 previene la síntesis de Acs contra la MBG, sin afectar a la producción de Acs contra el ADN, sugiriendo un papel esencial de la integrina $\alpha 4$ en la activación de clonos específicos de células B. Este efecto de HP2/1 es una evidencia *in vivo* de la posible existencia de un nuevo ligando para el VLA-4 expresado en los linfocitos, como ya ha sido demostrado en experimentos *in vitro*.

6. El tratamiento con el Ac HP2/1 se traduce a nivel renal en la prevención del desarrollo del infiltrado celular. Esto es debido al bloqueo de la ruta de extravasación VLA-4/VCAM-1 y no a un menor depósito de Ig en la membrana basal, como queda demostrado tras la administración pasiva de un antisuero contra la MBG a un grupo de animales tratados con HP2/1. Tampoco puede ser considerado consecuencia de una posible deplección leucocitaria que pudiera ser provocada por la administración del AcM HP2/1, como se evidencia tras el recuento leucocitario de sangre periférica. La ausencia de depósitos glomerulares de Ig contra la MBG en las ratas tratadas con el Ac HP2/1 se traduce en una reducción de los niveles de excreción de proteínas en la orina de más de un 80% en la totalidad de los animales tratados.

7. El tratamiento con anticuerpos contra la citoquina $\text{TNF}\alpha$ a ratas inyectadas con Cl_2Hg bloquea la infiltración de leucocitos y reduce en casi un 90% la proteinuria, sin detectarse ningún efecto sobre la síntesis de autoanticuerpos ni en el depósito de Ig en la membrana basal glomerular, sugiriendo que la presencia de TNF es esencial para el desarrollo del daño glomerular.

8. La administración de Cl_2Hg induce también, a nivel glomerular, la síntesis de TNF desde el día 4 de enfermedad y hasta el día 11, sugiriendo una acción directa del mercurio sobre las células intrínsecas del glomérulo, ya sean macrófagos residentes o células mesangiales. El efecto quimiotáctico del TNF inicia el reclutamiento de monocitos. La ausencia de niveles significativos de TNF en los glomérulos de ratas tratadas con HP2/1, así como la ausencia de infiltrado inflamatorio renal en el grupo tratado con Acs contra el $\text{TNF}\alpha$, sugiere un efecto "feedback" entre la síntesis de TNF y la entrada de monocitos vía VLA-4/VCAM-1.

9. El análisis de los sueros de las ratas tratadas con Cl_2Hg , con Acs HP2/1 y con Acs anti- $\text{TNF}\alpha$ para la detección de niveles de TNF dieron, en los tres grupos, resultados negativos lo que, junto con la detección a nivel glomerular de niveles altos de TNF en el Grupo Cl_2Hg , sugiere un papel preferentemente local de esta citoquina en el desarrollo de la lesión glomerular.

10. Tanto los grupos de ratas tratadas con Acs HP2/1 como con Acs anti- $\text{TNF}\alpha$ experimentan un temprano aumento en el porcentaje de células CD8^+ circulantes pudiendo ejercer un efecto supresor durante la fase de inducción de la enfermedad, contribuyendo a su temprana resolución.

11. Los efectos inmunosupresores logrados tras la administración de Acs contra la integrina $\alpha 4$, así como de Acs contra la citoquina $\text{TNF}\alpha$, indican que las terapias diseñadas para interferir, tanto las rutas de adhesión como los efectos causados por

factores solubles de la inflamación, pueden ser muy útiles en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, como son aquellas que afectan al riñón.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal, B.B.,** W.J. Kohr, P.E. Moffat, S.A. Spencer, W.J. Henzel, T.S. Bringman, G.E. Nedwin, D.W. Goeddel y R.N. Harkins. 1985. Human tumor necrosis factor. production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 260:2345-2354.
- Ahsman, E.J.M.,** H.M. Lokhorst, A.W. Dekker y A.C. Bloem. 1991. Lymphocyte function-associated antigen-1 expression on plasma cells correlates with Tumor Growth in multiple myeloma. *Blood* 79:2068-2075.
- Alarcón-Segovia, D.** 1976. Drug-induced antinuclear antibodies and lupus syndromes. *Drugs* 12:69-77.
- Alvarez, V.,** R. Pulido, M.R. Campanero, V. Paraiso, M.O. de Landázuri y F. Sánchez-Madrid. 1991. Differentially regulated cell surface expression of leukocyte adhesion receptors on neutrophils. *Kidney Int.* 40:899-905.
- Anderson, D.C. y** T.A. Springer. 1987. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in Mac-1, LFA-1 and pg150,95 glycoproteins. *Ann. Rev. Med.* 38:324-328.
- Angelillo, M.,** D.L. Greiner, J.P. Mordes, E.S. Handler, N. Nakamura, U. McKeever y A. Rossini. 1988. Absence of RT6+ T cells in diabetes-prone biobreeding/worcester rats is due to genetic and cell development defects. *J. Immunol.* 141:4146-4151.
- Arnaout, M.A.** 1990. Structure and function of leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75:1037-1050.
- Arroyo, A.G.,** P. Sánchez-Mateos, M.R. Campanero, I. Martín-Padura, E. Dejana y F. Sánchez-Madrid. 1992. Regulation of the VLA integrin-ligand interaction through the $\beta 1$ subunit. *J. Cell Biol.* 117:659-670.
- Aten, J.,** C.B. Bosman, G.J. Rozing, T. Stijnen, P.J. Hoedemaeker y G.J. Weening. 1988a. Mercuric chloride-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. Cellular kinetics and MHC antigen expression. *Am. J. Pathol.* 133:127-138.
- Aten, J.,** C.B. Bosman, E. de Heer, J. Hoedemaeker y J.J. Weening. 1988b. Cyclosporin A induces long-term unresponsiveness in mercuric chloride-induced autoimmune glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 73:307-311.
- Banks, K.L. y** J.B. Henson. 1972. Immunologically mediated glomerulitis of horses. II. Antiglomerular basement membrane antibody and other mechanisms in spontaneous disease. *Lab. Invest.* 26:708-715.
- Baran, D.,** B. Vendeville, M.C. Vial, C. Cosson, C. Bascou, P. Teychenne y P. Druet. 1986. Effect of cyclosporine A on mercury-induced autoimmune glomerulonephritis

in the Brown Norway rat. *Clin. Nephrol.* 25(suppl.1):S175-S180.

Baran, D., O. Lantz, P. Dosquet, A. Sfaksi y P. Druet. 1988. Interleukin-2 production in Brown Norway rats with HgCl₂-induced autoimmune disease: paradoxical *in vivo* versus *in vitro* findings. *Clin. Exp. Immunol.* 73:401-405.

Barclay, A.N. 1981. The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues. *Immunology* 42:593-600.

Bariéty, J., P. Druet, F. Laliberte y C. Sapin. 1971. Glomerulonephritis with 1c-globulin deposits induced in rats by mercuric chloride. *Am. J. Pathol.* 65:293-302.

Baron, J.L., J.A. Madri, N.H. Ruddle, G. Hashim y C.A. Janeway, Jr. 1993. Surface expression of $\alpha 4$ integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J. Exp. Med.* 177:57-68.

Baud, L., J.P. Oudinet, M. Bens, L. Noe, M.N. Peraldi, E. Rondeau, J. Etienne y R. Ardaillou. 1989. Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. *Kidney Int.* 35:1111-1118.

Bednarczyk, J.L. y B.W. McIntyre. 1990. A monoclonal antibody to VLA-4 α -chain (CDw49d) induces homotypic lymphocyte aggregation. *J. Immunol.* 144:777-784.

Bednarczyk, J.L. y B.W. McIntyre. 1992. Expression and ligand-binding function of the integrin $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) on neural-crest-derived tumor cell lines. *Clin. Exp. Metastasis* 10:281-290.

Beezhold, D.H., J.A. Leftwich y R.E. Hall. 1989. P48 induces tumor necrosis factor and IL-1 secretion by human monocytes. *J. Immunol.* 143:3217-3221.

Bellon, B., M. Capron, E. Druet, P. Verroust, M.-C. Vial, C. Sapin, J.F. Girard, J.M. Foidart, P. Mahieu y P. Druet. 1982. Mercuric chloride induced autoimmune disease in BN rats: sequential search for anti-basement membrane antibodies and circulating immune complexes. *Eur. J. Clin. Invest.* 12:127-133.

Bergelson, J.M., M.P. Shepley, B.M. Chan, M.E. Hemler y R.W. Finberg. 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* 255:1718-1720.

Bertani, T., M. Abbate, C. Zoja, D. Corna, N. Perico, P. Ghezzi y G. Remuzzi. 1989. Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit. *Am. J. Pathol.* 134:419- 430.

Bevilacqua, M.P., J.S. Pober, D.L. Mendrick, R.S. Cotran y M.A. Gimbrone. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 84:9238-9242.

Bevilacqua, M., E. Butcher, Barbara Furie, Bruce Furie, M. Gallatin, M. Gimbrone, J. Harlan, K. Kishimoto, L. Lasky, R. McEver, J. Paulson, S. Rosen, B. Seed, M. Sielgelman, T. Springer, L. Stoolman, T. Tedder, A. Varki, D. Wagner, I. Weissman y G. Zimmerman. 1991. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 67:233.

Bluestein, H.G., N.J. Zvaifler, N.H. Weisman, y R.F. Shapiro. 1979. Lymphocyte alteration by procainamide: relation to drug-induced lupus erythematosus syndrome. *Lancet* ii:816-819.

Bowman, C., D.K. Peters y C.M. Lockwood. 1983. Anti-glomerular basement membrane autoantibodies in the BN rat: detection by a solid-phase radioimmunoassay. *J. Immunol. Methods* 61:325-333.

Bowman, C., D.W. Mason, C.D. Pusey y C.M. Lockwood. 1984. Autoregulation of autoantibody synthesis in HgCl₂ nephritis in the BN rat. I. A role for T suppressor cells. *Eur. J. Immunol.* 14:464-470.

Bowman, C., C. Green, L. Borysiewicz y C.M. Lockwood. 1987. Circulating T-cell populations during mercuric chloride-induced nephritis in the Brown Norway rat. *Immunology* 61:515-520.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brady, H.R., M.D. Denton, W. Jiménez, S. Takata, D. Palliser y B.M. Brenner. 1992. Chemoattractants provoke monocyte adhesion to human mesangial cells and mesangial cell injury via CD11/CD18-ICAM-1 dependent and independent mechanisms. *Kidney Int.* 42:480-487.

Brady, H.R. y C.N. Serhan. 1992. Adhesion promotes transcellular leukotriene biosynthesis during neutrophil-glomerular endothelial cell interactions: inhibition by anti-CD18 and L-selectin monoclonal antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:1307-1314.

Brady, H.R. 1994. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int.* 45:1285-1300.

Brendt, A.R., D.L. Simmons, J. Tasey, C.I. Newbold y K. Marsh. 1989. Intercellular adhesion molecule-1 and endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 341:57-59.

Brennan, D.C., M.A. Yui, R.P. Wuthrich y V.E. Kelley. 1989. Tumor necrosis factor

and IL-1 in New Zealand black/white mice, enhanced gene expression and acceleration of renal injury. *J. Immunol.* 143:3470-3475.

Brennan, D.C., A.M. Jevnikar, F. Takei y V.E. Kelley. 1990. Mesangial cell accessory functions: mediation by intercellular adhesion molecule-1. *Kidney Int.* 38:1039-1046.

Brideau, R.J., P.B. Carter, W.R. McMaster, D.W. Mason y A.F. Williams. 1980. Two subsets of rat T lymphocyte defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 10:609-615.

Briskin, M.J., L. McEvoy y E.C. Butcher. 1993. Mad-CAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptor and to IgA. *Nature* 363:461-464.

Buchan, G., K. Barret, T. Fujita, T. Taniguchi, R. Maini y M. Feldmann. 1988a. Detection of activated T-cell products in the rheumatoid joint using cDNA probes to IL-2 receptor and IFN-gamma. *Clin. Exp. Immunol.* 71:295-301.

Buchan, G., K. Barret, M. Turner, D. Chantry, R. Maini y M. Feldmann. 1988b. IL-1 and TNF mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged expression of IL-1 α . *Clin. Immunol.* 73:449-455.

Burlington H. y E.P. Cronquite. 1973. Characteristics of cell cultures derived from renal glomeruli. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142:143-149.

Butcher, E.C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036.

Campanero, M.R., R. Pulido, M.A. Ursa, M. Rodríguez-Moya, M.O. de Landázuri y F. Sánchez-Madrid. 1990. An alternative leukocyte homotypic adhesion mechanism, LFA-1/ICAM-1-independent, triggered through the human VLA-4 integrin. *J. Cell Biol.* 110:2157-2165.

Campanero, M.R., A.G. Arroyo, R. Pulido, A. Ursa, M.S. de Matías, P. Sánchez-Mateos, P.D. Kassner, B.M.C. Chan, M.E. Hemler, A.L. Corbí, M.O. de Landázuri y F. Sánchez-Madrid. 1992. Functional role of $\alpha 2/\beta 1$ and $\alpha 4/\beta 1$ integrins in leukocyte intercellular adhesion induced through the common $\beta 1$ subunit. *Eur. J. Immunol.* 22:3111-3119.

Campbell, I.L., A. Cutri, D. Wilkinson, A.W. Boyd y L.C. Harrison. 1989. Intercellular adhesion molecule 1 is induced on isolated endocrine islet cells by cytokines but not by reovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4282-4286.

Campbell, I.L., T.W.H. Kay, L. Oxbrow y L.C. Harrison. 1991. Essential role for interferon gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. *J. Clin. Invest.* 87:739-742.

- Caspi, R.R.**, F.G. Roberge, C.G. Mcallister, M. El-Saied, T. Kuwabara, I. Gery, E. Hanna y R.B. Nussenblatt. 1986. T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J. Immunol.* 136:928-933.
- Castedo, M.**, L. Pelletier, R. Pasquier y P. Druet. 1994. Improvement of TH1 function during the regulation phase of mercury disease in Brown Norway rats. *Scan. J. Immunol.* 39:144-150.
- Cavallo, M.G.**, P. Pozzilli y R. Thorpe. 1994. Cytokines and autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 96:1-7.
- Chalopin, J.M.** y C.M. Lockwood. 1984. Autoregulation of autoantibody synthesis in HgCl₂ nephritis in the BN rat. II. Presence of antigen-augmentable plaque-forming cells in the spleen in associated with humoral factors behaving as autoanti-idiotypic antibodies. *Eur. J. Immunol.* 14:470-475.
- Chan, B.M.C.**, M.J. Elices, E. Murphy y M.E. Hemler. 1992. Adhesion to VCAM-1 and fibronectin: comparion of $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) and $\alpha 4\beta 7$ on human B cell line JY. *J. Biol. Chem.* 267:8366-8370.
- Chen, F.A.**, E.A. Repasky y K.B. Bankert. 1991. Human lung tumor-associated antigen identified as an extracellular matrix adhesion molecules. *J. Exp. Med.* 173:1111-1119.
- Chin Y.-H.**, J.-P. Cai y K. Johnson. 1990. Lymphocyte adhesion to cultured Peyer's Patch high endothelial venule cells is mediated by organ-specific homing receptors and can be regulated by cytokines. *J. Immunol.* 145:3669-3677.
- Chisholm, P.L.**, C.A. Williams y R.R. Lobb. 1993. Monoclonal antibodies to the integrin α -4 subunit inhibit the murine contact hypersensitivity response. *Eur. J. Immunol.* 23:682-688.
- Cordell, J.L.**, B. Falini, W.N. Erber, A.K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. McDonald, K.A.F. Pulford, H. Stein y D.Y. Mason. 1984. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP Complex). *J. Histochem. Cytochem.* 32:229-239.
- Cosimi, A.B.**, D. Conti, F.L. Delmonico, F.I. Preffer, S.-L. Wee, R. Rothlein, R. Faanes y R.B. Colvin. 1990. *In vivo* effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in no human primates with renal allografts. *J. Immunol.* 144:4604-4612.
- Cybulsky, M.I.** y M.A. Gimbrone Jr. 1991. Endothelial expression of mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251:788-791.
- Dallman, M.J.**, D.W. Mason y M. Webb. 1982. The roles of host and donor cells in the rejection of skin allografts by T cell-deprived rats injected with syngenic T cells.

Eur. J. Immunol. 12:511-518.

Daum, J.R., D.M. Shepherd y R.J. Noelle. 1993. Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocyte function. *Int. J. Immunopharmacol.* 15:383-394.

Deguchi, Y. y S. Kishimoto. 1991. Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in autoimmune pulmonary inflammation in lupus-prone mice. *Clin. Exp. Immunol.* 85:392-395.

Dejana, E., I. Martín-Padura, D. Lauri, S. Bernasconi, M.R. Bani, A. Garofalo, R. Giavazzi, J. Magnani, A. Mantovani y S. Menard. 1992. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to vascular endothelium is inhibited by an antibody to Lewis fucosylated type I carbohydrate chain. *Lab Invest.* 66:324-330.

Denton, M.D., P.A. Marsden, F.W. Luscinskas, B.M. Brenner y H.R. Brady. 1991. Cytokine-induced phagocyte adhesion to human mesangial cells. Role of CD11/CD18 integrins and ICAM-1. *Am. J. Physiol.* 261:F1071-F1079.

Deusch, K., U. Moebius, K.H. Meyer zum Büschenfelde y S.C. Meuer. 1986. T lymphocyte control of autoreactivity: analysis with human T clones and limiting dilution culture. *Eur. J. Immunol.* 16:1433-1438.

Dijkstra, C.D., E.A. Döpp, P. Joling y G. Kraal. 1985. The heterogeneity of mononuclear phagocytes: distinct macrophages subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54:589-599.

Dinarello, C.A. 1991. Inflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* 3:941-948.

Dinther-Janssen, A.C. van, E. Horst, G. Koopman, W. Newman, R.J. Scheper, C.J.L.M. Meijer y S.T. Pals. 1991. The VLA-4/VCAM-1 pathway is involved in lymphocyte adhesion to endothelium in rheumatoid synovium. *J. Immunol.* 147:4207-4210.

Druet, E., C. Sapin, E. Günther, N. Feingold y P. Druet. 1977. Mercuric chloride-induced anti-glomerular basement membrane antibodies in the rat. Genetic control. *Eur. J. Immunol.* 7:348-351.

Dubey, C., B. Bellon, F. Hirsch, J. Kuhn, M.-C. Vial, M. Coldman y P. Druet. 1991. Increased expression of class II Major Histocompatibility Complex molecules on B cells in rats susceptible or resistant to HgCl₂-induced autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 86:118-123.

Dubey, D., J. Kuhn, M.-C. Vial, P. Druet y B. Bellon. 1993. Anti-IL-2 receptor

monoclonal antibody therapy supports a role for TH1-like cells in HgCl₂-induced autoimmunity in rats. *Scand. J. Immunol.* 37:406-412.

Dustin, M.L. y T.A. Springer. 1988. Lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) interaction with inter-cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.* 107:321-331.

Eastman, A.Y. y A. Lawrence. 1982. TNP-modified syngeneic cells enhance immunoregulatory T cell activities similar to allogeneic effects. *J. Immunol.* 128:926-931.

Elices, M.J., L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M.E. Hemler y R.R. Lobb. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60:577-584.

Elliott, M., R. Maini, M. Feldmann, A. Long-Fox, P. Charles y F. Brennan. 1993. Treatment of rheumatoid arthritis with chimaeric monoclonal antibodies to TNF α . Safety clinical efficacy and regulation of the acute phase response. *Br. J. Rheumatol.* 32:(suppl.1):107.

Erle, D.J., C. Rüegg, D. Sheppard y D. Pytela. 1991. Complete amino acid sequence of an integrin beta subunit ($\beta 7$) identified in leukocytes. *J. Biol. Chem.* 266:11009-11016.

Esnault, V.L.M., P.W. Mathieson, S. Thiru, D.B.G. Oliveira y C.M. Lockwood. 1992. Autoantibodies to myeloperoxidase in Brown Norway rats treated with mercuric chloride. *Lab. Invest.* 67:114-120.

Faull, R.J., N.L. Kovach, J.M. Harlan y M.H. Ginsberg. 1993. Affinity modulation of integrin $\alpha 5 \beta 1$: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J. Cell. Biol.* 121:155-162.

Feldmann, M., F.M. Brennan, D. Chantry, C. Haworth, M. Turner, P. Katsikis, M. Londei, E. Abney, G. Butchan, K. Barret, A. Corcoran, M. Kissonerghis, R. Zheng, B. Grubeck-Loebenstien, D. Barkley, C.Q. Chu, M. Field y R.N. Maini. 1991. Cytokines assays: role in the evolution of the pathogenesis of autoimmunity. *Immunol. Rev.* 119:105-123.

Feurer, C., L.H. Chow y J.F. Borel. 1988. Preventive and therapeutic effects on cyclosporin A valine²-dihydrocyclosporin in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Immunology* 63:219-223.

Finnegan, A., B.W. Needleman y R.J. Hodes. 1984. Activation of B cells by autoreactive T cells: cloned autoreactive T cells activate B cells by two distinct

pathways. *J. Immunol.* 133:78-85.

Freedman, A.S., K. Rhyhart, Y. Nojima, J. Svahn, L. Eliseo, C.D. Benjamin, C. Morimoto y E. Vivier. 1993. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation in human B cells after ligation of $\beta 1$ integrin VLA-4. *J. Immunol.* 150:1645-1652.

Gal  a, P., Y. Lebranchu, G. Thibault y P. Bardos. 1992. Interleukin-4 and tumor necrosis factor α induce different adhesion pathways in endothelial cells for the binding of peripheral blood lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 36:575-585.

Gerritsen, M.E., K.A. Kelley, G. Ligon, C.A. Perry, C.P. Shen, A. Szczepanski y W.W. Carley. 1993. Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 36:593-602.

Giménez, A., F. Leyva-Cobi  n, C. Fierro, M. Río, T. Bricio y F. Mampaso. 1987. Effect of cyclosporin A on autoimmune tubulointerstitial nephritis in the Brown Norway rat. *Clin. Exp. Immunol.* 69:550-556.

Gleichmann, H.I.K., S.T. Pals y T. Radaszkiewicz. 1983. T cell-dependent B-cell proliferation and activation induced by administration of the drug diphenylhydantoin to mice. *Hematol. Oncol.* 1:165-176.

Goidl, E.A., A.F. Schrater, G.W. Siskind y G.J. Thorbecke. 1979. Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response to TNP-ficoll. II. Hapten-reversible inhibition of anti-TNP plaque-forming cells by immune serum as an assay for auto-anti-idiotypic antibody. *J. Exp. Med.* 150:154-165.

Goidl, E.A., T. Hayama, G.M. Shepherd, G.W. Siskind y G.J. Thorbecke. 1983. Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response. VI. Hapten augmentation of plaque formation and hapten-reversible inhibition of plaque formation as assay for anti-idiotypic antibody. *J. Immunol. Methods* 58:1-17.

Goldman, M., P. Druet y E. Gleichmann. 1991. TH2 cells in systemic autoimmunity: insights from allogeneic disease and chemically-induced autoimmunity. *Immunol. Today* 12:223-227.

Green, M.L., J.L. Reade y C.F. Ware. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* 70:257-268.

Greiner, D.L., E.S. Handler, K. Nakano, J.P. Mordes y A.A. Rossini. 1986. Absence of the RT6 T cells subsets in diabetes-prone BB/W rat. *J. Immunol.* 136:148-151.

Greve, J.M., G. Davis, A.M. Meyer, C.P. Fprte, S.C. Yost, C.W. Marlor, M.E.

Kamarck y A. McClelland. 1989. The major human *Rhinovirus* receptor is ICAM-1. *Cell* 56:839-847.

Griffith, L.D., R.E. Bulger y B.F. Trump. 1967. The ultrastructure of the functioning kidney. *Lab. Invest.* 16:220-235.

Gritzka, T.L., y B.F. Trump. 1968. Renal tubular lesions caused by mercuric chloride. Electron microscopic observations: degeneration of the pars recta. *Am. J. Pathol.* 52:1225-1277.

Grönhagen-Riska, C., E. von Willebrand, T. Tikkanen, E. Honkanen, A. Miettinen, H. Holthöfer y T. Törnroth. 1990. The effect of cyclosporin A on the interstitial mononuclear cell infiltration and the induction of Heymann's nephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 79:266-272.

Guéry, J.-C., E. Druet, D. Goltz, F. Hirsch, C. Mandet, E. de Heer y P. Druet. 1990. Specificity and cross-reactive idiotypes of anti-glomerular basement membrane antibodies in HgCl₂-induced autoimmune glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* 20:93-100.

Gutknecht, J. 1981. Inorganic mercury (Hg²⁺) transport through lipid bilayer membranes. *J. Membrane Biol.* 61:61-66.

Halloran, P.F., J. Urmson, V. Ramassar, C. Laskin y P. Autenried. 1988. Increased class I and class II MHC products and mRNA in kidneys of MRL-lpr/lpr mice during autoimmune nephritis and inhibition by cyclosporine. *J. Immunol.* 141:2303-2312.

Harning, R., J. Pelletier, G. Van, F. Takei, V.J. Merluzzi. 1992. Monoclonal antibody to MALA-2 (ICAM-1) reduced acute autoimmune nephritis in KDKD mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64:129-134.

Hauser, S.L., A.K. Bahn, M. Che, F. Gilles y H.L. Weiner. 1984. Redistribution of Lyt-bearing T cells in acute murine experimental allergic encephalomyelitis: selective migration of Lyt-1 cells to the central nervous system is associated with a transient depletion of Lyt-1 cells in peripheral blood. *J. Immunol.* 133:3037-3042.

Held, W., H.R. McDonald, I.L. Weissman, M.W. Hess y C. Mueller. 1990. Genes encoding tumor necrosis factor α and granzyme A are expressed during development of autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2239-3343.

Hemler, M.E., D. Glass, J.S. Coblyn y J.G. Jacobson. 1986. Very late activation antigens on rheumatoid synovial fluid T lymphocytes. Association with stages of T cell activation. *J. Clin. Invest.* 78:696-702.

Hemler, M.E. 1990. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and

their role on leukocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 8:365-400.

Higuchi, M., T. Diamantstein, H. Osawa y R.R. Caspi. 1991. Combined anti-interleukin-2 receptor and low-dose cyclosporine therapy in experimental autoimmune uveoretinitis. *J. Autoimmun.* 4:113-124.

Hill, S., P.J. Milla, A. Ciampolillo, G. Napolitano, G.F. Bottazzo y R. Mirakian. 1992. LFA-1 and ICAM-1 molecule expression in jejunal mucosa from children with autoimmune enteropathy. *Autoimmunity* 13:233-241.

Hinglais, N., P. Druet, J. Grossetet, C. Sapin y J. Bariety. 1979. Ultrastructural study of nephritis induced in Brown Norway rats by HgCl₂. *Lab. Invest.* 41:150-159.

Hirsch, F., J. Couderc, C. Sapin, G. Fournie y P. Druet. 1982. Polyclonal effect of HgCl₂ in the rat, its possible role in an experimental autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* 12:620-625.

Hruby Z.W., K. Shirota, S. Jothy y R.P. Lowry. 1991. Antiserum against tumor necrosis factor α and protease inhibitor reduce immune glomerular injury. *Kidney Int.* 40:43-51.

Huang, Y.P., P.A. Miescher y R.H. Zubler. 1986. The interleukin 2 secretion defect *in vitro* in systemic lupus erythematosus is reversible in rested cultured T cells. *J. Immunol.* 137:3515-3520.

Huang, K., J.S. Geoffroy, M.S. Singer y S.D. Rosen. 1991. A lymphocyte homing receptor (L-selectin) mediates the *in vitro* attachment of lymphocytes to myelinated tract of the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 88:1778-1783.

Hultman, P. y S. Eneström. 1988. Mercury induced antinuclear antibodies in mice: Characterization and correlation with renal immune complex deposits. *Clin. Exp. Immunol.* 71:269-274.

Isobe, M., H. Yagita, K. Okumura y A. Ihara. 1992. Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 255:1125-1127.

Issekutz, T.B. 1993. Dual inhibition of VLA-4 and LFA-1 maximally inhibits cutaneous delayed type hypersensitivity induced inflammation. *Am. J. Pathol.* 143:1286-1293.

Janeway, C.A., S. Carding, B. Jones, J. Murray, P. Portoles, R. Rasmussen, J. Rojo, K. Saizawa, J. West y K. Bottomly. 1988. CD4⁺ T cells: specificity and function. *Immunol. Rev.* 101:39-80.

Jacob, C.O., P.H. van der Meide y H.O. McDevitt. 1987. *In vivo* treatment of (NZB x NZW)F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to gamma interferon. *J. Exp.*

Med. 166:798-803.

Jacob, C.O. y **H.O. McDevitt.** 1988. A role for tumor necrosis factor- α in murine autoimmune "lupus" nephritis. *Nature* 331:356-358.

Jacob, C.O., S. Aiso, S.A. Michie, H.O. McDevitt y H. Acha-Orbea. 1990. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF- α and interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:968-972.

Jelinek, D.F. y **P.E. Lipsky.** 1987. Regulation of human B lymphocyte. Activation, proliferation, and differentiation. *Adv. Immunol.* 40:1-59.

Johnstone, A. y **R. Thorpe.** 1987. En "Immunohistochemistry in Practice". Eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Cap. 2, pg 30-47.

Kalb, V.F. y **R.W. Bernolhr.** 1977. A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal. Biochem.* 82:362-371.

Karkar, M.A., Y. Koshino, S.J. Cashman, A.C. Dash, J. Bonnefoy, A. Meager, A.J. Rees. 1992. Passive immunization against TNF- α and IL-1 β protects from LPS enhancing glomerular injury in nephrotoxic nephritis in rats. *Clin. Exp. Immunol.* 90:312-318.

Karniski, L.P. 1992. Hg²⁺ and Cu²⁺ are ionophores, mediating Cl⁻/OH⁻ exchange in liposomes and rabbit renal brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 267:19218-19225.

Kaskel, F.J., P. Devarajan, L.A. Arbeit y L.C. Moore. 1988. Effects of cyclosporin on renal hemodynamics and autoregulation in rats. *Transplant. Proc.* 20(suppl.3):603-609.

Kawasaki, K., E. Yaoita, T. Yamamoto, T. Tamatani, M. Miyasaka y I. Kihara. 1993. Antibodies against intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 prevent glomerular injury in rat experimental crescentic glomerulonephritis. *J. Immunol.* 150:1074-1083.

Kerjaschki, D., P.P. Ojha, M. Susani, R. Horvat, S. Binder, A. Hovorka, P. Hillemanns y R. Pytela. 1989. A β 1-integrin receptor for fibronectin in human kidney glomeruli. *Am. J. Pathol.* 134:481-489.

Kirtland, H.H., III, D.N. Mohler, y D.A. Horowitz. 1980. Methyldopa inhibition of suppressor-lymphocyte function. A proposed cause of autoimmune hemolytic anemia. *N. Engl. J. Med.* 302:825-832.

Klinman, D.M. 1990. IgG1 and IgG2a production by autoimmune B cells treated *in vitro* with IL-4 and IFN-gamma. *J. Immunol.* 144:2529-2534.

- Kobayakawa, T., J. Louis, S. Izui, y P.H. Lambert.** 1979. Autoimmune response to DNA, red blood cells, and thymocyte antigens in association with polyclonal antibody synthesis during experimental african trypanosomiasis. *J. Immunol.* 122:296-301.
- Koch, A.E., J.C. Burrows, G.K. Haines, T.M. Carlos, J.M. Harlam y S.J. Leibovich.** 1991. Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues. *Lab Invest.* 64:313-320.
- Kone, B.C., R.M. Brenner y S.R. Gullans.** 1990. Sulfhydryl-reactive heavy metals increase cell membrane K^+ and Ca^{2+} transport in renal proximal tubule. *J. Memb. Biol.* 113:1-12.
- Kosuda, L.L., A. Wayne, M. Nahounou, D.L. Greiner y P.E. Bigazzi.** 1991. Reduction of the RT6.2⁺ subset of T lymphocytes in Brown Norway rats with mercury-induced renal autoimmunity. *Cell. Immunol.* 135:154-167.
- Kreisberg, J.J., D.B. Wayne y M.J. Karnovsky.** 1979. Rapid and focal loss of negative charge associated with mononuclear cell infiltration early in nephrotoxic serum nephritis. *Kidney Int.* 16:290-300.
- Kroemer, G. y G. Wick.** 1989. The role of interleukin 2 autoimmunity. *Immunol. Today* 10:246-251.
- Kuhn, K., G.B. Ryan, S.J. Hein, R.G. Galaske y M.J. Karnovsky.** 1977. An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in rat nephrotoxic nephritis. *Lab. Invest.* 36:375-387.
- Kuruvilla, A.P., R. Shah, G.M. Hochwald, M.A. Palladino y G.J. Thorbecke.** 1991. Protective effect of transforming growth factor β 1 on experimental autoimmune disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2918-2921.
- Kyan-Aung, U., D.O. Haskard, R.N. Poston, M.H. Thornhill y T.H. Lee.** 1991. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 mediate the adhesion of eosinophils to endothelial cells *in vitro* and are expressed by endothelium in allergic cutaneous inflammation *in vivo*. *J. Immunol.* 146:521-528.
- Laffón, A., R. García-Vicuña, A. Humbría, A.A. Postigo, A.L. Corbí, M.O. de Landázuri y F. Sánchez-Madrid.** 1991. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 88:546-552.
- Laffón, A.** 1992. Moléculas de adhesión: características estructurales y funcionales. *Rev. Esp. Reumatol.* 19:368-377.
- Lan, H.Y., D.J. Paterson, P. Hutchinson y R.C. Atkins.** 1991. Leukocyte involvement

in the pathogenesis of pulmonary injury in experimental Goodpasture's syndrome. *Lab. Invest.* 64:330-338.

Lang, F., S. Pogu, C. Maurel, B. Charbonnel y P. Sai. 1987. Production of a response to interleukin 2 by blood mononuclear cells from some type 1 diabetic patients. *Diabete Metab.* 13:37-43.

Larson, R.S. y T.A. Springer. 1990. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114:181-217.

Lasky, L.A. 1992. Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258:964-969.

Laupacis, A., C. Gardell, C. Dupre, C.R. Stiller, P. Keown, A.C. Wallace y P. Thibert. 1983. Cyclosporin prevents diabetes in BB Wistar rats. *Lancet* i:10-15.

Levin, J. y F.B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19:186-189.

Lipsky, P.E., L.S. Davis, J.J. Gush y N. Oppenheimer-Marks. 1989. The role of cytokines in the pathogenesis of reumatoid arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* 11:123-162.

Lo, S.K., J. Everitt, J. Gu, y A.B. Malik. 1992. Tumor necrosis factor mediates experimental pulmonary edema by ICAM-1 and CD18-dependent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 89:981-988.

Lund, B.O., D.M. Miller y J.S. Woods. 1993. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 45:2017-2024.

Ma, X.-L., P.S. Tsao, y A.M. Lefer. 1991. Antibody to CD18 exerts endothelial and cardiac protective effect in myocardial ischemia and reperfusion. *J. Clin. Invest.* 88:1237-1243.

Mackay, C.R. 1992. Migration pathways and immunologic memory among T lymphocytes. *Semin. Immunol.* 4:51-58.

Mampaso, F., J. Egido, J.C. Martínez-Montero, T. Bricio, E. González, M.E. Cobo, E. Pirotzky, P. Braquet y L. Hernando. 1989. Interstitial mononuclear cell infiltrates in experimental nephrosis: effect of PAF antagonist. *Nephrol. Dial. Transpl.* 4:1037-1044.

Mampaso, F., F. Sánchez-Madrid, A. Molina, T. Bricio, F. Liaño y V. Alvarez. 1992. Expression of adhesion receptors and counterreceptors from the leukocyte-endothelial

adhesion pathways LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 on drug-induced tubulointerstitial nephritis. *Am. J. Nephrol.* 12:391-392.

Mampaso, F., F. Sánchez-Madrid, R. Marcén, A. Molina, J. Pascual, T. Bricio, A. Martín y V. Alvarez. 1993. Expression of adhesion molecules in allograft renal dysfunction. A distinct diagnostic pattern in rejection and cyclosporin nephrotoxicity. *Transplantation* 56:687-691.

Mandema, E., A. Arends, J. van Zeijst, G. Vermeer, G.K. van der Hem y L.B. van der Slikke. 1963. Mercury and the kidney. *Lancet* i:1266.

Manolios, N., L. Schreiber, M. Nelson y C.L. Geczy. 1989. Enhanced interferon-gamma (IFN) production by lymph node cells from autoimmune (MRL/l, MRL/n) mice. *Clin. Exp. Immunol.* 76:301-306.

Martín, A., A. Molina, T. Bricio y F. Mampaso. 1994. Passive dual immunization against TNF α and IL-1 β maximally ameliorates acute aminonucleoside nephrosis. *Clin. Exp. Immunol.* (En prensa).

Mathieson, D.W., S. Thiru y D.B.G. Oliveira. 1992. Mercuric chloride-treated Brown Norway rats develop widespread tissue injury including necrotizing vasculitis. *Lab. Invest.* 67:121-129.

McCabe, M.J. y D.A. Lawrence. 1990. The heavy metal lead exhibits B cell-stimulatory factor activity by enhancing B cell Ia expression and differentiation. *J. Immunol.* 145:671-677.

McEver, R.P. 1992. Leukocyte-endothelial cell interaction. *Current Op. Cell Biol.* 4:840-849.

McKnight, A.J., A.N. Barclay y W. Mason. 1991. Molecular cloning of rat interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire of subsets of CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 21:1187-1194.

McMaster, W.R. y A.F. Williams. 1979. Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur. J. Immunol.* 9:426-433.

Meide, van der P.H., M.C. de Labie, C.A. Botman, W.P. van Bennekom, T. Olson, J. Aten y J.J. Weening. 1993. Mercuric chloride down-regulates T cell interferon-gamma production in Brown Norway but not in Lewis rats; role of glutathione. *Eur. J. Immunol.* 23:675-681.

Metcalf, R.A., N. Tandon, T. Tamatani, M. Miyasaka y A.P. Weetman. 1993. Adhesion molecule monoclonal antibodies inhibit experimental autoimmune thyroiditis. *Immunology* 80:493-497.

- Mihatsch, M.J.,** G. Thiel, V. Basler, B. Ryffel, J. Landmann J. von Overbeck y H.U. Zollinger. 1985. Morphological patterns in cyclosporin-treated renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 17(suppl.4):101-106.
- Miller K.B.** y D. Salem. 1982. Immune regulatory abnormalities produced by procainamide. *Am. J. Med.* 73:487-492.
- Mirtcheva, J.,** C. Pfeiffer, J.A. de Bruijn, F. Jacquesmart y E. Gleichmann. 1989. Immunological alterations inducible by mercuric compounds. III. H-2A acts as an immune response and H-2E as an immune "suppression" locus for HgCl₂-induced antinuclear autoantibodies. *Eur. J. Immunol.* 19:2257-2261.
- Molina, A.,** T. Bricio, A. Martín y F. Mampaso. 1992. Expresión y distribución de moléculas de adhesión en la nefritis tubulointersticial aguda medicamentosa y en otras enfermedades renales. *Nefrología* XII(supl.4):40-47.
- Morales, J.M.,** A. Andrés, J.M. Alcázar, C. Prieto, I. Díaz de Tueste, L.M. Ruilope y J.L. Rodicio. 1988. Usefulness of fractional excretion of sodium as index of cyclosporin nephrotoxicity in renal transplantation. *Transplant. Proc.* 20(suppl.3):691-699.
- Mosmann, T.R.** y R.L. Coffman. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and function of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46:111-147.
- Muller, G.A.,** J. Markovic-Liprovski y C.A. Muller. 1991. Intercellular adhesion molecule-1 expression in human kidneys with glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 36:203-208.
- Mulligan, M.S.,** K.J. Johnson, R.F. Todd, III, T.B. Issekutz, M. Miyasaka, T. Tamatani, C.W. Smith, D.C. Anderson y P.A. Ward. 1993a. Requeriments for leukocyte adhesion molecules in nephrotoxic nephritis. *J. Clin. Invest.* 91:577-587.
- Mulligan, M.S.,** C.W. Smith, D.C. Anderson, R.F. Todd, III, M. Miyasaka, T. Tamatani, T.B. Issekutz y P.A. Ward. 1993b. Role of leukocyte adhesion molecules in complement-induced lung injury. *J. Immunol.* 150:2401-2406.
- Mulligan, M.S.,** G.P. Wilson, R.F. Todd, III, C.W. Smith, D.C. Anderson, J. Varani, T.B. Issekutz, M. Miyasaka, T. Tamatani, J.R. Rusche, A.A. Vaporciyan y P.A. Ward. 1993c. Role of $\beta 1$, $\beta 2$ integrins and ICAM-1 in lung injury after deposition of IgG and IgA immune complexes. *J. Immunol.* 150:2407-2417.
- Nagataki, S.** y K. Eguchi. 1992. Cytokines and immune regulation in thyroid autoimmunity. *Autoimmunity* 13:27-34.
- Nemeth, E.F.** y A. Scarpa. 1987. Rapid mobilization of Ca²⁺ in bovine parathyroid cells

evoked by extracellular divalent cations. Evidence for a cell surface calcium receptor. *J. Biol. Chem.* 262:5188-5196.

Nhieu, G.T. van y R.R. Isberg. 1991. The *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the $\alpha 5 \beta 1$ integrin receptor. *J. Biol. Chem.* 266:24367-24375.

Nojima, Y., M.J. Humphries, A.P. Mould, A. Komoriya, K.M. Yamada, S.F. Schlossman y C. Morimoto. 1990. VLA-4 mediates CD3-dependent CD4⁺ T cell activation via the CS1 alternatively spliced domain of fibronectin. *J. Exp. Med.* 172:1185-1192.

Nojima, Y., D.M. Rothstein, K. Sugita, S.F. Schlossman, C. Morimoto. 1992. Ligation of VLA-4 on T cells stimulates tyrosine phosphorylation of 150 kD protein. *J. Exp. Med.* 175:1045-1053.

Ochel, M., H.-W. Vohr, C. Pfeiffer y E. Gleichmann. 1991. IL-4 is required for the IgE and IgG1 increase and IgG1 antibody formation in mice treated with mercuric chloride. *J. Immunol.* 146:3006-3011.

Oppenheim, J.J., F.W. Ruscetti y C. Faltynek. 1991. Cytokines. En "Basic and clinical immunology". Eds. D.P. Stites y A.I. Terr. Cap. 7 pg:78-100.

Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso y R. Lobb. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule-1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59:1203-1211.

Pantaleo, G., L. Butini, C. Graziosi, G. Poli, S.M. Schnittman, J.J. Greenhouse, J.I. Gallin y A.S. Fauci. 1991. Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4⁺ T lymphocytes genetically deficient in LFA-1: LFA-1 is required for HIV-mediated cell fusion but not for viral transmission. *J. Exp. Med.* 173:511-514.

Paul, W.E. y J. Ohara. 1987. B-cell stimulatory factor-1/IL-4. *Ann. Rev. Immunol.* 5:429-459.

Pelletier, L., R. Pasquier, F. Hirsch, C. Sapin y P. Druet. 1985. *In vivo* self-reactivity of mononuclear cells to T cells and macrophages exposed to HgCl₂. *Eur. J. Immunol.* 15:460-465.

Pelletier, L., R. Pasquier, F. Hirsch, C. Sapin y P. Druet. 1986. Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmune disease: *in vitro* demonstration. *J. Immunol.* 137:2548-2554.

Pelletier, L., R. Pasquier, C. Guettier, M.-C. Vial, C. Mandet, D. Nochy, H. Bazin y P. Druet. 1988a. HgCl₂ induces T and B cells to proliferate and differentiate in BN

rats. *Clin. Exp. Immunol.* 71:336-342.

Pelletier, L., R. Pasquier, J. Rossert, M.-C. Vial, C. Mandet y P. Druet. 1988b. Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity. Ability to induced the autoimmune disease. *J. Immunol.* 140:750-754.

Pelletier, L., J. Rossert, R. Pasquier, M.-C. Vial y P. Druet. 1990. Role of CD8⁺ T cells in mercury-induced autoimmunity or immunosuppression in the rat. *Scand. J. Immunol.* 31:65-74.

Pettipher, E.J., G.A. Higgs y B. Henderson. 1986. Interleukin-1 induces leukocyte infiltration and cartilage degradation in the synovial joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8742-8753.

Phan, S.H., M. Charaee-Kermani, B. McGarry, S.L. Kunkel y F.W. Wolber. 1990. Regulation of rat pulmonary artery endothelial cell transforming growth factor- β production by IL-1 β and tumor necrosis factor α . *J. Immunol.* 149:103-106.

Pietsch, P., H.-W. Vohr, K. Degitz y E. Gleichmann. 1989. Immunological alterations inducible by mercuric compounds. II. HgCl₂ and gold sodium thiomalate enhance serum IgE and IgG concentrations in susceptible mouse strains. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 90(suppl):47-53.

Pober, J.S., M.A. Gimbrone, L.A. Lapierre, D.L. Mendrick, W. Fiers, R. Rothlein y T.A. Springer. 1986. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J. Immunol.* 137:1893-1896.

Pober, J.S. y R.S. Cotran. 1990. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* 70:427-451.

Pober, J.S. y R.S. Cotran. 1991. What can be learned from the expression of the endothelial adhesion molecules in tissue?. *Lab. Invest.* 64:301-305.

Postigo, A.A., R. Pulido, M.R. Campanero, A. Acevedo, A. García-Pardo, A.L. Corbí, F. Sánchez-Madrid y M.O. de Landázuri. 1991. Differential expression of VLA-4 integrin by resident and peripheral blood B lymphocytes. Adquisition of functionally active α 4 β 1-fibronectin receptors upon B cell activation. *Eur. J. Immunol.* 21:2437-2445.

Postigo, A.A., R. García-Vicuña, F. Díaz-González, A.G. Arroyo, M.O. de Landázuri, G. Chi-Rosso, R.R. Lobb, A. Laffón y F. Sánchez-Madrid. 1992. Increased binding of synovial T lymphocytes from rheumatoid arthritis to ELAM-1 and VCAM-1 endothelial adhesion molecules. *J. Clin. Invest.* 89:1445-1452.

- Postigo, A.A., R. García-Vicuña, A. Laffón y F. Sánchez-Madrid.** 1993a. The role of adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 16:69-76.
- Postigo, A.A., J. Teixidó y F. Sánchez-Madrid.** 1993b. The $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 adhesion pathway in physiology and disease. *54th Forum in Immunology. Adhesion molecules in leukocyte-endothelium interactions* pg: 723-736.
- Postigo, A.A., P. Sánchez-Mateos, A.I. Lazarovits, F. Sánchez-Madrid y M.O. de Landázuri.** 1993c. $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates B cell binding to fibronectin and VCAM-1. Expression and function of $\alpha 4$ integrins on human B lymphocytes. *J. Immunol.* 151:2471-2483.
- Poston, R.N., D.O. Haskard, J.R. Coucher, N.P. Gall y R.R. Johnson-Tidey.** 1992. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* 140:665-673.
- Prouvost-Danon, A., A. Abadie, C. Sapin, H. Bazin y P. Druet.** 1981. Induction of IgE synthesis and potentiation of anti-ovalbumin IgE antibody response by HgCl₂ in the rat. *J. Immunol.* 126:699-702.
- Pulido, R., M.J. Elices, M.R. Campanero, L. Osborn, S. Schiffer, A. García-Pardo, R. Lobb, M.E. Hemler y F. Sánchez-Madrid.** 1991. Functional evidence for three distinct and independently inhibitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4. *J. Biol. Chem.* 266:10241-10245.
- Pusey, C.D., C. Bowman, A. Morgan, A.P. Weetman, B. Hartley y C.M. Lockwood.** 1990. Kinetics and pathogenicity of autoantibodies induced by mercuric chloride in Brown Norway rats. *Clin. Exp. Immunol.* 81:76-82.
- Rice, G.E. y M.P. Bevilacqua.** 1989. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246:1303-1306.
- Rice, G.E., J.M. Munro y M.P. Bevilacqua.** 1990. Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. *J. Exp. Med.* 171:1369-1374.
- Rice, G.E., J.M. Munro, C. Coless y M.P. Bevilacqua.** 1991. Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues. *Am. J. Pathol.* 138:385-393.
- Romain, P.L., C. Morimoto, J.F. Daley, L.S. Palley, E.L. Reinherz y S.F. Schlossman.** 1984. Reactivity of inducer cell subsets and T8-cell activation during the human autologous mixed lymphocyte reaction. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 30:117-128.
- Rose, N.R.** 1989. Pathogenic mechanisms in autoimmune disease. *Clin. Immunol.*

Immunopathol. 53:S7-S16.

Rosen, G.D., J.R. Sanes, R. LaChance, J.M. Cunningham, J. Roman y D.C. Dean. 1992. Roles for the integrin VLA-4 and its counter-receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* 69:1107-1119.

Rosenberg, Y.J., A.D. Steinberg y T.J. Santoro. 1984. T cells from autoimmune "IL-2-defective" MRL-lpr/lpr mice continue to grow *in vitro* and produce IL-2 constitutively. *J. Immunol.* 133:2545-2548.

Rossert, J., L. Pelletier, R. Pasquier y P. Druet. 1988. Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity demonstration by limiting dilution analysis. *Eur. J. Immunol.* 18:1761-1766.

Rothlein, R., M.L. Dustin, S.D. Marlin y T.A. Springer. 1986. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* 167:1270-1274.

Ruddle, N.H., C.M. Bergman, K.M. McGrath, E.G. Lingenheld, M.L. Grunnet, S.J. Padula y R.B. Clark. 1990. An antibody to liphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer to experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 172:1193-1200.

Rüegg, C., A.A. Postigo, E.E. Sikorski, E.C. Butcher, R. Pytela y D.J. Erle. 1992. Role of integrin $\alpha 4\beta 7/\alpha 4\beta P$ in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J. Cell Biol.* 117:179-189.

Sáez-Llorens, X., H.S. Jafari, C. Severien, F. Parras, K.D. Olsen, E.J. Hansen, I.I. Singer y G.H. McCracken Jr. 1991. Enhanced attenuation of meningeal inflammation and brain edema by concomitant administration of anti-CD18 monoclonal antibodies and dexamethasone in experimental haemophilus meningitis. *J. Clin. Invest.* 88:2003-2011.

Saito, T. y K. Rajewsky. 1985. A self-Ia reactive T cell clone directly stimulates every hundredth B cell and helps anti-gen-specific B cell responses. *Eur. J. Immunol.* 15:927-934.

Sánchez-Madrid, F., M.O. de Landázuri, G. Morago, M. Cebrián, A. Acevedo y C. Bernabeu. 1986. VLA-3: A novel polypeptide association within the VLA molecular complex: cell distribution and biochemical characterization. *Eur. J. Immunol.* 16:1343-1349.

Sano, K., I. Fujisawa, R. Abe, Y. Assano y T. Tada. 1987. MHC-restricted minimal regulatory circuit initiated by a class II-autoreactive T cell clone. *J. Exp. Med.* 165:1284-1295.

- Saoudi, A., J. Kuhn, K. Huygen, Y. de Kozak, T. Velu, M. Goldman, P. Druet y B. Bellon. 1993a. TH2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a TH1-dependent autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* 23:3096-3103.
- Saoudi, A., J. Kuhn, K. Huygen, Y. de Kozak, T. Velu, M. Goldman, P. Druet y B. Bellon. 1993b. Role of the TH1-TH2 balance in the development of autoimmunity. *Transplant. Proc.* 25:2824-2825.
- Sapin, D., E. Druet y P. Druet. 1977. Induction of anti-glomerular basement membrane antibodies in the Brown Norway rat by mercuric chloride. *Clin. Exp. Immunol.* 28:173-179.
- Sapin, C., P. Druet y C. Mandet. 1980. Induction of susceptibility to HgCl₂ immune glomerulonephritis in the Lewis rat by immunocompetent cells from susceptible F1 hybrids. *Eur. J. Immunol.* 10:371-374.
- Sapin, C., F. Hirsch, J.-P. Delaporte, H. Bazin, P. Druet. 1984. Polyclonal IgE increase after HgCl₂ injections in BN and Lew rats: a genetic analysis. *Immunogenetics* 20:227-236.
- Schattner, A. 1988. Review: Interferons and autoimmunity. *Am. J. Med. Sci.* 31:532-544.
- Schattner, A. 1994. Lymphokines in autoimmunity. A critical review. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 70:177-189.
- Scheynius, A., R.L. Camp y E. Puré. 1993. Reduced contact sensitivity reactions in mice treated with monoclonal antibodies to leukocyte function-associated molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.* 150:655-663.
- Schreiner, G.F., R.S. Cotran, V. Pardo, E.R. Unanue. 1978. A mononuclear cell component in experimental immunological glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 147:369-384.
- Schweighoffer, T., Y. Tanaka, M. Tindswell, D.J. Erle, K.J. Horgan, G.E. Ginther-Luce, A.I. Lazarovits y S. Shaw. 1993. Selective expression of integrin $\alpha 4\beta 7$ on a subset of human CD4⁺ memory T cells with hallmarks of guttrophism. *J. Immunol.* 151:717-729.
- Sekido, N., N. Mukaida, A. Harada, I. Nakanishi, Y. Watanabe y K. Matsushima. 1993. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 365:654-657.
- Selmaj, K., C. Raine, B. Canella y C.F. Brosnan. 1991. Identification of lymphotoxin and TNF in multiple sclerosis lesions. *J. Clin. Invest.* 87:949-954.

- Shall, T.J., K. Bacon, K.J. Toy y D.V. Goeddel.** 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669-671.
- Sharief, M.K. y R. Hentges.** 1991. Association between TNF- α and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N. Eng. J. Med.* 325:467-472.
- Shenker, B.J., P. Berthold, C. Rooney, L. Vitale, K. DeBolt y I.M. Shapiro.** 1993. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 15:87-112.
- Shibata, S., H. Sakaguchi, T. Nagasawa y T. Naruse.** 1972. Nephritogenic glycoprotein. II. Experimental production of membranous glomerulonephritis in rats by single injection of homologous renal glycopeptide. *Lab. Invest.* 27:457-465.
- Shih, W., W.H. Hines, E.G. Neilson.** 1988. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney Int.* 33:1113-1118.
- Shimizu, Y., G.A. van Seventer, E. Ennis, W. Newman, K.J. Horgan y S. Shaw.** 1992. Crosslinking of the T cell-specific accessory molecules CD7 and CD28 modulates T cell adhesion. *J. Exp. Med.* 175:577-582.
- Smith, M.W., P.C. Phelps y B.F. Trump.** 1991. Cytosolic Ca²⁺ deregulation and blebbing after HgCl₂ injury to cultured rabbit proximal tubule cells as determined by digital imaging microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4926-4930.
- Springer, T.A.** 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434.
- Springer, T.A.** 1994. Traffic signals for lymphocytes recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.
- Stadtman, E.R. y C.N. Olivers.** 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 266:2005-2008.
- Stauton, D.E., V.J. Merluzzi, R. Rothlein, R. Barton, S.D. Marlin y T.A. Springer.** 1989. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for *Rhinoviruses*. *Cell* 56:849-853.
- Stenglein, B., G.H. Thones y E. Gunther.** 1975. Genetically controlled autologous immune complex glomerulonephritis in rats. *J. Immunol.* 115:895-897.
- Stimpson, S.A., F.G. Dallford, I.G. Otterness y J.H. Schwab.** 1988. Exacerbation of arthritis by IL-1 in rat joints previously injured by peptidoglycan-polysaccharide. *J. Immunol.* 140:2964-2968.

- Strooper, B. de, B. van der Schueren, M. Jasper, M. Saison, M. Spaepen, F. van Leuven, H. van der Berghe y J.J. Cassiman.** 1989. Distribution of the $\beta 1$ subgroup of the integrin in the human cells and tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 37:299-307.
- Sunderland, C.A., W.R. McMaster y A.F. Williams.** 1979. Purification with monoclonal antibody of a predominant leukocyte-common antigen glycoprotein from rat thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 9:155-159.
- Tan, X.X., C. Tang, A.F. Castoldi, L. Manzo y L.G. Costa.** 1993. Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 38:159-170.
- Tanaka, Y., D.H. Adams, S. Hubscher, H. Hirano, U. Siebenlist y S. Shaw.** 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 β . *Nature* 361:79-82.
- Taylor, G.M., A. Williams, S.W. D'Souza, W.D., Ferguson, D. Donnai, J. Fennell y R. Harris.** 1988. The expression of CD18 is increased in Trisomy 21 (Down syndrome) lymphoblastoid cells. *Clin. Exp. Immunol.* 71:324-328.
- Thomson, S.C., B.J. Tucker, F. Gabbai y R.C. Blantz.** 1989. Functional effects on glomerular hemodynamics of short-term chronic cyclosporin in male rats. *J. Clin. Invest.* 83:960-969.
- Thornhill, M.H., S.M. Wellicome, D.L. Mahiouz, J.S.S., Lanchbury, U. Kyan-Aung y D.O. Haskard.** 1991. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. *J. Immunol.* 146:592-598.
- Tipping, P.G., T.W. Leong y S.R. Holdsworth.** 1991a. Tumor necrosis factor production by glomerular macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rabbits. *Lab. Invest.* 65:272-279.
- Tipping, P.G., M.G. Lowe y S.R. Holdsworth.** 1991b. Glomerular interleukin-1 production is dependent on macrophage infiltration in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int.* 39:103-110.
- Todd, I., R. Pujol-Borrel, L.J. Hammond, G.F. Bottazzo y M. Feldmann.** 1985. Interferon-gamma induced HLA-DR expression by thyroid epithelium. *Clin. Exp. Immunol.* 61:265-273.
- Tomosugi, N.I., S.J. Cashman, H. Hay, C.D. Pusey, D.J. Evans, A. Shaw y A. Rees.** 1989. Modulation of antibody-mediated glomerular injury *in vivo* by bacterial lipopolysaccharide, TNF, and IL-1. *J. Immunol.* 142:3083-3090.
- Tsujisaki, M., K. Imai, H. Hirata, Y. Hazawa, J. Masuya, T. Nakano, T. Sugiyama, M. Matsui, Y. Hinoda y A. Yachi.** 1991. Detection of circulating intercellular adhesion

molecule-1 antigen in malignant disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85:3-8.

Tsukada, N., M. Matsuda, K. Miyagi y N. Yanagisawa. 1993. Adhesion of cerebral endothelial cells to lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *Autoimmunity* 14:329-333.

Unanue, E.R. y F.J. Dixon. 1967. Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathogenetic mechanisms. *Adv. Immunol.* 6:1-90.

Virelizier, J.-L., N. Pérez, F. Arenzana-Seisdedos y R. Devos. 1984. Pure interferon gamma enhances class II HLA antigens on human monocyte cell lines. *Eur. J. Immunol.* 14:106-108.

Watson, S.R., C. Fennie y L.A. Lasky. 1991. Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by soluble homing receptor-IgG chimera. *Nature* 349:164-167.

Wayner, E.A., A. García-Pardo, M.J. Humphries, J.A. McDonald y W.G. Carter. 1989. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell. Biol.* 109:1321-1330.

Weening, J.J., G.J. Fleuren, y J. Hoedemaeker. 1978. Demonstration of antinuclear antibodies in mercuric chloride-induced glomerulopathy in the rat. *Lab. Invest.* 39:405-410.

Weening, J.J., J. Hoedemaeker y W.W. Bakker. 1981. Immunoregulation and anti-nuclear antibodies in Hg-induced glomerulopathy in the rat. *Clin. Exp. Immunol.* 45:64-71.

Weetman, A.P., D.J. Volkman, K.D. Burman, T.L. Gerrard y A.S. Fauci. 1985. The *in vitro* regulation of human thyrocyte HLA-DR antigen expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61:817-824.

Weg, V.B., T.J. Williams, R.R. Lobb y S. Nourshargh. 1993. A monoclonal antibody recognizing very late activation antigen-4 inhibits eosinophils accumulation *in vivo*. *J. Exp. Med.* 177:561-566.

Whiting, P.H., D.J. Propper, J.G. Simpson, J. McKay, M.C. Jones y G.R.D. Catto. The use of lithium clearance measurements to assess renal tubular function in experimental and clinical cyclosporin nephrotoxicity. *Transplant. Proc.* 20(suppl.3):675-680.

Wicks, I.P., T. Leizer, S.O. Wawryk, J.R. Novotny, J. Hamilton, G. Vitti y A.W. Boyd. 1992. The effect of cytokines on the expression of MHC antigens and ICAM-1 by normal and transformed synoviocytes. *Autoimmunity* 12:13-19.

- Willenborg, D.O., R.D. Simons, T. Tamatani y M. Miyasaka.** 1993. ICAM-1-dependent pathway is not critically involved in the inflammatory process of autoimmune encephalomyelitis or in cytokine-induced inflammation of the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 45:147-154.
- Williams, R.M. y M.J. Moore.** 1973. Linkage of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis to the major histocompatibility locus in the rat. *J. Exp. Med.* 138:775-783.
- Williams, A.F., G. Galfree y C. Milstein.** 1977. Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma-hybrid antibodies: differentiation antigens of rat lymphocyte. *Cell* 12:663-673.
- Williams, A.F. y A.N. Barclay.** 1988. The immunoglobulin superfamily. Domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6:391-405.
- Williams, D.A., M. Rios, C. Stephens y V.P. Patel.** 1991. Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interaction. *Nature* 352:438-441.
- Wilson, C.B. y F.J. Dixon.** 1973. Antiglomerular basement membrane antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* 3:74-84.
- Wollett, G.R., A.W. Barclay, M. Purkavek y A.F. Williams.** 1985. Molecular and antigenic heterogeneity of the rat lymphocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 15:168-173.
- Wright, J.R., P.E. Lacy, E.R. Unanue, C. Muszynski y V. Hauptfeld.** 1986. Interferon-mediated induction of Ia antigen expression on isolated murine whole islets and dispersed islet cells. *Diabetes.* 35:1174-1177.
- Wuthrich, R.P., A.M. Jevnikar, F. Takei, L.H. Glimcher y V.E. Kelley.** 1990. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression is upregulated in autoimmune murine lupus nephritis. *Am. J. Pathol.* 136:441-450.
- Wuthrich, R.P. y T.L. Snyder.** 1992. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in murine lupus nephritis. *Kidney Int.* 42:903-914.
- Yale, J.-F. y E.B. Marliss.** 1984. Altered immunity and diabetes in the BB rat. *Clin. Exp. Immunol.* 57:1-11.
- Yard, B.A., R.D. Mohamed, M. Kooymans-Couthino, J.A. Bruijn, M.E. Paape, E. Schrama, L.A. van Es y F.J. van der Woude.** 1992. IL-1 α stimulated TNF α production by cultures human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 42:383-389.
- Yednock, T.A. y S.D. Rosen.** 1989. Lymphocyte homing. *Adv. Immunol.* 44:313-378.

Yednock, T.A., C. Cannon, L.C. Fritz, F. Sánchez-Madrid, L. Steinman y N. Karin. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha 4\beta 1$ integrin. *Nature* 356:63-66.

Young, N.S., J. Levin y R.A. Prendergast. 1972. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mechanisms. *J. Clin. Invest.* 51:1790-1795.

Yuan, Q., W.-M. Jiang, G.W. Krinssansen y J.D. Watson. 1990. Cloning and sequence analysis of a novel $\beta 2$ -related integrin transcript from T lymphocytes: homology of integrin cysteine-rich repeats to domain III of laminin B chains. *Int. Immunol.* 2:1097-1108.

Yurochko, A.D., D.Y. Liu, D. Eierman y S. Haskill. 1992. Integrin as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9034-9038.

Zheng, R.Q.H., E.R. Abney, C.Q. Chu, M. Field, B. Grubeck-Loebenstein, R.N. Maini y M. Feldmann. 1991. Detection of interleukin-6 and interleukin-1 production in human thyroid epithelial cells by non-radioactive *in situ* hybridization and immunohistochemical methods. *Clin. Exp. Immunol.* 83:314-319.

Zheng, R.Q.H., E.R. Abney, C.Q. Chu, M. Field, R.N. Maini, J.R. Lamb y M. Feldmann. 1992. Detection of *in vivo* production of tumor necrosis factor- α by human thyroid epithelial cells. *Immunology* 75:456-462.

Zimmerman, G.A., K. Groehler, y G.J. Beirne. 1975. Hydrocarbon exposure and chronic glomerulonephritis. *Lancet* ii:199-201.

Esta tesis ha dado origen a la publicación del artículo:

"Prevention of mercuric chloride-induced nephritis in the Brown Norway rat by treatment with antibodies against the α 4 integrin". **A. Molina**, F. Sánchez-Madrid, T. Bricio, A. Martín, A. Barat, V. Alvarez y F. Mampaso. *J. Immunol.* 153:2313-2320, 1994.